

**Associação de alisquireno e L-arginina melhora a
atividade simpática e função renal na hipertensão
renovascular**

Renata Viana Tiradentes

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Fevereiro 2015

Associação de alisquireno e L-arginina melhora a atividade simpática e função renal na hipertensão renovascular

Renata Viana Tiradentes

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em / / por:

Profª Drª Glaucia Rodrigue Abreu – Orientadora, UFES

Profª Drª Sônia Alves Gouvêa – Coorientadora, UFES

Prof Drª Nazaré Souza Bissoli

Prof Dr. Hélder Mauad

Prof Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto

Coordenador do PPGCF: Profª. Drª. Ivanita Stefanon

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Fevereiro 2015

Tiradentes, Renata Viana 1983

Associação de alisquireno e L-arginina melhora a atividade simpática e a função renal na hipertensão renovascular [Vitória] 2015

127p., 29,7cm (UFES, Ciências Fisiológicas, 2015)

Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas,
Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Glaucia Rodrigues Abreu

1. Hipertensão Renovascular 2. Atividade do nervo simpático renal 3. Alisquireno 4.
L-Arginina 5. Função renal.

A Deus, autor e consumidor da minha fé;

Ao meu marido, Bruno, com todo amor e carinho;

À minha filha, Isabela, razão da minha existência;

Aos meus pais, Sebastião e Sandra, indispensáveis nesta minha caminhada.

Essa vitória também pertence a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho, me guiando e mostrando a direção certa a seguir. Que todo o louvor, a honra e a glória sejam oferecidos somente a Ti!

À Professora Dr^a. Glaucia Rodrigues de Abreu, pela confiança e oportunidade que me permitiu chegar até aqui. Professora, obrigada!

À Professora, doutora, amiga, parceira de todas as horas, Sônia Alves Gouvêa, por me incentivar e me encorajar em muitos momentos de dificuldade. A sua amizade, força e ensinamentos foram essenciais.

Ao Professor Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto, pela confiança, zelo e atenção dispensados. Um grande exemplo que sempre seguirei. Exemplo de pesquisador, a começar pelo entusiasmo, ética, dedicação e seriedade para com a ciência e exemplo de ser humano, sempre gentil e generoso. Muito obrigada!

À amiga Cintia Helena Santuzzi, pela grande amizade constituída, por todos os momentos felizes e difíceis que compartilhamos.

Aos amigos de Laboratório: Patrick, Erick, Vinicius, Paulo, Mariana, Fabrício e Simone. Vocês tornaram meu trabalho muito mais divertido e prazeroso! Agradeço especialmente ao Fabrício pela confecção das figuras deste trabalho e ao Vinicius e Paulo pelo comprometimento, responsabilidade, auxílio nos experimentos e cuidados com os animais.

Aos professores Nyam Florêncio da Silva e Nazaré de Souza Bissoli, por terem aberto as portas de seus laboratórios para mim e pela valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

Aos professores do PPGCF pelos conhecimentos compartilhados no decorrer do curso, e que em muito contribuíram para o meu crescimento.

Ao meu pai Sebastião pelo incentivo em todos os momentos.

À minha mãe Sandra e minha segunda mãe, Ia, por estarem sempre e incondicionalmente ao meu lado e por terem suprido a minha ausência, cuidando do meu bem mais precioso, Isabela!

Ao meu marido Bruno, um grande amigo em todos os momentos da minha vida. Obrigada por acreditar na realização desta conquista. Te amo!

E claro, a minha filha Isabela por ter me concedido o maior título que eu poderia ter em toda a minha vida: o de mãe! Você deu sentido à minha vida!

A toda a minha família e amigos, por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso.

Com certeza esse trabalho foi desenvolvido com a colaboração de todos vocês.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A hipertensão renovascular é caracterizada pelo aumento da atividade simpática renal, Angiotensina II e pela disfunção endotelial. O objetivo deste estudo foi o de determinar o papel da atividade do nervo simpático renal (ANSR) na mediação dos efeitos anti-hipertensivos do alisquireno (ALSK) e L-arginina (L-ARG) em um modelo experimental de hipertensão renovascular. A hipertensão foi induzida pela implantação de um clipe de prata na artéria renal direita, e em seguida os animais foram divididos em 5 grupos: SHAM operado; 2-rins, 1-clipe (2R1C); 2R1C tratado com ALSK (2R1C ALSK); 2R1C tratado com L-ARG (2R1C L-ARG); e 2R1C tratado com associação de ALSK e L-ARG (2R1C ALSK+L-ARG). A pressão arterial sistólica (PAS) de ratos 2K1C aumentou de $114,4 \pm 5,2$ para $204 \pm 12,7$ mmHg ($p < 0,05$) e só foi reduzida no grupo 2R1C ALSK+L-ARG ($138,4 \pm 4,37$ mmHg). A hipertensão 2R1C aumentou a ANSR basal (SHAM: $62,4 \pm 6,39$ vs 2R1C: $97,4 \pm 8,43\%$). Os tratamentos com L-ARG ou ALSK+L-ARG diminuiu significativamente a ANSR basal (2R1C L-ARG: $70,7 \pm 2,39$; 2R1C ALSK + L-ARG: $69,3 \pm 4,23\%$), mas o mesmo não ocorreu com ALSK (2R1C ALSK: $84,2 \pm 2,5 \%$). A excreção urinária de água, Na^+ , Cl^- e ureia foram semelhantes nos grupos 2R1C L-ARG, 2R1C ALSK + L-ARG e SHAM. A combinação de ALSK+L-ARG restaurou o fluxo urinário e a taxa de filtração glomerular. A expressão de nNOS no rim não-clipado foi aumentada significativamente nos ratos 2R1C ALSK+L-ARG. Em conclusão, a combinação de ALSK e L-ARG normaliza a PAS e previne a disfunção renal em ratos com hipertensão renovascular, um efeito que pode ser parcialmente atribuído à redução da ANSR.

Palavras-chave: hipertensão 2R1C, Alisquireno, L-arginina, função renal, atividade do nervo simpático renal.

ABSTRACT

Renovascular hypertension is characterized by increased renal sympathetic activity, angiotensin II, and by endothelial dysfunction. The purpose of this study was to determine the role of renal sympathetic nerve activity (RSNA) in mediating the anti-hypertensive effects of aliskiren (ALSK) and L-arginine (L-ARG) in a rat renovascular hypertension model. Hypertension was induced by clipping the right renal artery, and the following 5 groups were divided: Sham operated; 2-kidney, 1-clip (2K1C); 2K1C plus ALSK; 2K1C plus L-ARG; and 2K1C plus ALSK+ L-ARG. The systolic blood pressure (SBP) of 2K1C rats increased from 114.4 ± 5.2 to 204 ± 12.7 mmHg, ($P < 0.05$) and was only reduced by ALSK+L-ARG treatment (138.4 ± 4.37 mmHg). The 2K1C hypertension increased the baseline RSNA (SHAM: 62.4 ± 6.39 vs 2K1C: $97.4 \pm 8.43\%$). L-ARG or ALSK+L-ARG treatment significantly decreased baseline RSNA (2K1C L-ARG: 70.7 ± 2.39 ; 2K1C ALSK+L-ARG: $69.3 \pm 4.23\%$), but ALSK treatment alone did not (2K1C ALSK: $84.2 \pm 2.5\%$). Urinary water, Na^+ , Cl^- and urea excretion were similar in the 2K1C L-ARG, 2K1C ALSK+L-ARG and SHAM groups. The combination of ALSK+L-ARG restored urine flow and increased the glomerular filtration rate. The nNOS expression in the non clipped kidney was significantly increased in 2K1C ALSK+L-ARG rats. In conclusion, combined ALSK+L-ARG treatment normalizes SBP and prevents renal dysfunction in 2K1C hypertensive rats, an effect that can be partially attributed to reduced RSNA.

Key words: 2K1C hypertension, Aliskiren, L-arginine, renal function, renal sympathetic nerve activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK+L-ARG) sobre a pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.....57

Tabela 2: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) após injeção de fenilefrina (FE) e nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.....62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos renais da implantação do clipe na artéria renal.....	18
Figura 2: Representação esquemática das fases da hipertensão 2R1C.....	20
Figura 3: Cascata do Sistema Renina-Angiotensina.....	23
Figura 4: Ações sistêmicas da Angiotensina II sobre diferentes sistemas.....	24
Figura 5: Via de formação e mecanismo de ação do óxido nítrico (NO).....	36
Figura 6: Organograma do protocolo experimental.....	45
Figura 7: Esquema representativo do método de transferência das proteínas.....	53
Figura 8: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre o peso dos rins clipados (RC) (A) e não-clipados (RNC) (B) em ratos 2R1C.....	58
Figura 9: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre o peso do ventrículo esquerdo (VE) (A) e do ventrículo direito (VD) (B) em ratos 2R1C.....	59

Figura 10: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a atividade do nervo simpático renal (ANSR) basal em ratos 2K1C.....60

Figura 11: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a atividade do nervo simpático renal (ANSR) em ratos 2R1C após injeção de fenilefrina (FE) e nitroprussiato de sódio (NPS).....61

Figura 12: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a concentração de ureia plasmática em ratos 2R1C.....63

Figura 13: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a excreção de sódio (Na^+ , em A), potássio (K^+ , em B), cloreto (Cl^- , em C) e ureia (D) em ratos 2R1C.....64

Figura 14: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre o volume de excreção (A), fluxo urinário (B) e taxa de filtração glomerular (C) em ratos 2R1C.....65

Figura 15: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a expressão protéica de nNOS no rim clipado (A) e no rim não-clipado (B) de ratos 2R1C.....66

Figura 16: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a expressão protéica de iNOS no rim clipado (A) e no rim não-clipado (B) de ratos 2R1C.....67

Figura 17: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a expressão protéica de eNOS no rim clipado (A) e no rim não-clipado (B) de ratos 2R1C.....68

LISTA DE ABREVIATURAS

2R1C – Dois rins, 1 clipe

ALSK – Alisquireno

Ang A – Angiotensina A

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang III – Angiotensina III

Ang IV – Angiotensina IV

Ang1-12 – Angiotensina 1-12

Ang1-7 – Angiotensina 1-7

Ang1-9 – Angiotensina 1-9

ANSR – Atividade do nervo simpático renal

AT₁ – Receptor do tipo 1 da Angiotensina II

AT₂ – Receptor do tipo 2 da Angiotensina II

BH₄ – Tetrahydrobiopterina

BRAT₁ – Bloqueadores dos receptores da Angiotensina II tipo 1

BSA – Albumina bovina

CaM – Calmodulina

Cl⁻ - Cloreto

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ECA2 – Enzima conversora de angiotensina tipo 2

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FC – Frequência cardíaca

FE – fenilefrina

FMN – Flavina mononucleotídeo

GMPc – Guanosina 3'5'- monofosfato

GTP – Guanosina monofosfato

i.v. – Intravenoso

IECA – Inibidores da enzima conversora de angiotensina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

K⁺ - Potássio

L-ARG – L-arginina

L-NAME – N-G-nitro-L-arginina metilestér

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MrgD – Receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas, membro D

Na⁺ - Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NEP – Endopeptidase neutral

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NPS – Nitroprussiato de sódio

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial Sistólica

PEP – Prolil-endopeptidase

PKG – Proteína quinase G

PVN – Núcleo paraventricular

RC – Rim clipado

RNA_m – RNA mensageiro

RNC – Rim não-clipado

RVLM – Bulbo ventrolateral rostral

SNC – Sistema Nervoso Central

SNS – Sistema Nervoso Simpático

SRAA – Sistema Renina-Angiotensin-Aldosterona

TFG – Taxa de filtração glomerular

TOP – Thimet oligopeptidase

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 HIPERTENSÃO RENOVASCULAR	15
1.2 HIPERTENSÃO DE GOLDBLATT DOIS RINS, UM CLIPE	17
1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA	21
1.4 O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO	30
1.5 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA HIPERTENSÃO	34
 2 JUSTIFICATIVA	 40
 3 OBJETIVOS	 42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
 4 MATERIAIS E MÉTODOS	 44
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	44
4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	44
4.2.1 Tratamento	44
4.2.2 Produção da Hipertensão Renovascular 2R1C	45
4.2.3 Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica	46
4.2.4 Análise da medida direta da pressão arterial sistólica	47
4.2.5 Análise da função renal e estimativa da massa dos rins e ventrículos	47
4.2.6 Registro da atividade do nervo simpático renal	48

4.2.7 Expressão protéica da nNOS, iNOS e eNOS.....	50
4.2.7.1 Preparação dos rins e quantificação de proteínas.....	50
4.2.7.2 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	52
4.2.7.3 Transferência das proteínas.....	52
4.2.7.4 Incubação dos anticorpos.....	53
4.2.7.5 Revelação.....	54
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5 RESULTADOS.....	56
5.1 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO 2R1C.....	56
5.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE O PESO DO CORAÇÃO E DOS RINS.....	57
5.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A ATIVIDADE DO NERVO SIMPÁTICO RENAL.....	59
5.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A FUNÇÃO RENAL.....	62
5.5 EXPRESSÃO DA nNOS, iNOS E eNOS NO RIM CLIPADO E NÃO-CLIPADO DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.....	66
6 DISCUSSÃO.....	69
7 REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE: Artigo enviado à revista Hypertension Research (aceito em 25/01/2015).....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e mantidos da pressão arterial. Associa-se, frequentemente, às alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo, como, por exemplo, no coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos; e também às alterações metabólicas, que aumentam o risco de disfunções cardiovasculares fatais e não fatais (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). As principais consequências da hipertensão são infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e a doença renal crônica terminal, levando a uma redução da expectativa e da qualidade de vida dos indivíduos (Duncan, Schmidt, Giugliani, 2006; Pullalarevu, Akbar, Teehan, 2014). Diante disto, constata-se que a hipertensão é um importante problema de saúde pública, pois além de apresentar custos médicos e socioeconômicos elevados, promove cerca de 7,6 milhões de mortes no mundo por década (Macmahon, 1995; Williams, 2008; Pimenta & Oparil, 2010). Atualmente, a prevalência de hipertensão gira em torno de 29% na população nos Estados Unidos e 32% no Brasil (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010; Al-Suraih & Grande, 2014).

Apesar dos esforços para desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão arterial, na maioria dos casos, cerca de 95%, não é possível precisar uma condição médica ou doença específica e conhecida. Fatores genéticos, má alimentação, sedentarismo e obesidade são fatores habitualmente

envolvidos na hipertensão. Em contrapartida, a hipertensão arterial secundária se caracteriza pela existência de um fator desencadeador conhecido, passível ou não de correção. A incidência de hipertensão secundária é pouco conhecida. A doença renovascular, doença renal intrínseca, hiperaldosteronismo primário e apnéia obstrutiva do sono representam as causas mais comuns de hipertensão secundária (Pullalarevu, Akbar, Teehan, 2014).

A hipertensão renovascular é caracterizada pela redução da pressão de perfusão renal, causada por uma lesão estenótica ou obstrutiva de uma ou ambas as artérias renais, levando a um aumento da atividade do sistema-renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) prejudicando a excreção de sódio e água (Ledingham, 1971; Cabral et al., 1997). A causa mais comum da estenose da artéria renal, provocada por doença intrínseca da artéria, é a doença ateromatosa, respondendo por cerca de 90% dos casos, seguidas pela displasia fibromuscular. Sua prevalência é estimada em 2% da população de hipertensos, entretanto, tem-se observado uma prevalência diferenciada quando se considera a faixa etária e o perfil clínico dos pacientes (Praxedes, 2002), sendo que 7% dos pacientes acima de 65 anos de idade apresentam hipertensão renovascular e em pacientes com doença arterial coronariana ou doença aorto-iliaca, sua prevalência é tão elevada como 50% (Al-Suraih & Grande, 2014). Além de ser uma das principais causas de hipertensão secundária, a hipertensão renovascular é uma importante causa de insuficiência renal, chamada de nefropatia isquêmica, sendo inclusive diagnosticada em pacientes em fase dialítica, principalmente, em pacientes ateroscleróticos mais idosos, mas também em pacientes jovens portadores de arterite, sendo que a incidência de hipertensão renovascular como uma causa de doença renal terminal aumentou 12,4% ao ano (Praxedes, 2002; Al-Suraih & Grande, 2014).

O grau de obstrução da artéria renal prevê a sobrevivência dos pacientes, sendo que a taxa de sobreviventes em 4 anos para os pacientes que apresentam oclusão luminal <75% é de 89%, no entanto, nos pacientes com oclusão luminal > 75% é de apenas 57% (Al-Suraih & Grande, 2014). Diante da gravidade deste tipo de hipertensão, faz-se necessário o conhecimento de um tratamento eficaz.

A hipertensão renovascular possui fisiopatologia intimamente relacionada ao SRAA, o qual é um mecanismo fisiológico bem conhecido de controle da pressão arterial, uma vez que é um importante regulador da homeostase eletrolítica renal (Navar et al., 1998). Diante disto, é possível simular experimentalmente este tipo de hipertensão em ratos, resultando em um modelo de hipertensão desenvolvido por Goldblatt e conhecido como dois rins, um clipe (2R1C), uma vez que este modelo se assemelha em muitos aspectos à hipertensão renovascular humana (Navar et al., 1998).

1.2 HIPERTENSÃO DE GOLDBLATT DOIS RINS, UM CLIPE

O modelo experimental 2R1C é um modelo clássico de hipertensão renovascular que foi desenvolvido por Goldblatt e colaboradores em 1934, que introduziram um clipe de prata na artéria renal de um dos rins de cães, mantendo o rim contralateral íntegro. Neste modelo de hipertensão experimental a estenose promovida pelo clipe não é grave o suficiente para causar isquemia; no entanto, a redução da pressão de perfusão renal estimula o aumento da síntese e liberação de renina a partir do rim clipado (Navar et al., 1998).

Como representado na Figura 1, a cascata de eventos iniciada pelo aumento da secreção de renina no rim clipado leva a aumento na circulação de angiotensina II (Ang II), que por sua vez inibem a produção de renina no rim não-clipado. A reduzida capacidade de síntese de renina é claramente refletida pelos níveis reduzidos de RNA mensageiro (RNAm) de renina encontrados no rim não-clipado. Apesar da depleção de renina e os níveis reduzidos de seu RNAm no rim não-clipado, o conteúdo de Ang II neste rim também aumenta, porém através de mecanismos não dependentes da renina. O aumento de Ang II circulante, com consequente aumento da produção de aldosterona e da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) contribui para redução da capacidade excretora do rim não-clipado, o que justifica o fato deste rim não ser capaz de restaurar a pressão arterial (Navar et al., 1998). Além disso, o rim contralateral (não estenótico) apresenta aumento na produção de RNAm para angiotensinogênio e aumento na atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) intrarenal (Navar et al., 2002).

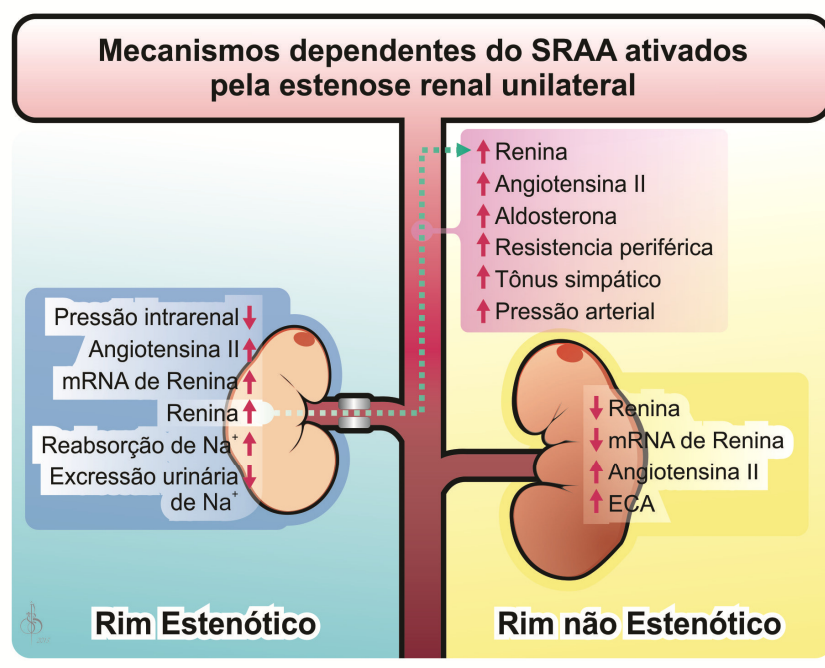


Figura 1: Efeitos renais da implantação do clipe na artéria renal. Modificado de Navar et al., 1998.

O SRAA tecidual “órgão-específico” atua de maneira independente do sistema SRAA plasmático. Tem-se observado que o SRAA circulante é responsável por processos agudos, enquanto a ativação do SRAA tecidual está envolvida na resposta de um processo crônico, como um remodelamento estrutural secundário às alterações cardiovasculares (Wang, Zhang, Liu, 2013). O SRAA locais e sistêmicos ativados de maneira exacerbada podem causar efeitos deletérios nos rins e contribuir para uma perda progressiva da função renal (Roscioni, Heerspink, de Zeeuw, 2013).

São reconhecidas três fases no desenvolvimento e manutenção da hipertensão 2R1C em animais experimentais, apesar de ser impossível delinear essas fases na hipertensão renovascular humana. A elucidação das diferentes fases permitiu uma melhor compreensão dos papéis desempenhados pelos sistemas envolvidos na gênese e manutenção dessa hipertensão, tais como o SRAA, o SNS e suas interações mútuas (Martinez-Maldonado, 1991). O tempo de manutenção da hipertensão e os níveis pressóricos atingidos no modelo 2R1C dependem da espécie e do grau de estenose da artéria renal (Lerman et al., 2005).

A primeira fase da hipertensão de Goldblatt dura cerca de 4 semanas após a implantação do clipe e é marcada por aumento imediato na pressão sanguínea associada com aumento da atividade da renina plasmática e de angiotensina (Pradhan & Rossi, 2013). Já no primeiro dia após a implantação do clipe na artéria renal, observa-se uma pequena elevação da pressão arterial (Lerman et al., 2005). Esta fase é mediada principalmente pela ativação do SRAA bem como pela retenção de sal e água e expansão de volume, no entanto, há evidências que indicam um importante papel do SNS (Figura 2).

A segunda fase da hipertensão 2R1C ocorre entre a 5ª e a 8ª semana após a implantação do clipe e é marcada pela estabilização ou aumento da pressão arterial, com retenção de sal, expansão do volume e regulação negativa do SRAA. Embora esta fase não tenha sido tão bem estudada como a fase inicial, existem evidências que apoiam o papel de Ang II como um mediador importante para promover a retenção de sal e expansão do volume. Dentre os vários mecanismos pelos quais a Ang II exerce sua função, destaca-se o aumento da liberação de noradrenalina a partir das glândulas supra-renais e terminações nervosas. A estimulação do receptor adrenérgico provoca aumento da reabsorção de sódio no túbulo proximal. A Ang II também pode exercer um efeito local através da estimulação do nervo eferente renal, o qual também aumenta a reabsorção de sódio.

A terceira fase da hipertensão 2R1C ocorre nove semanas ou mais após a clipagem da artéria renal. Esta fase caracteriza-se por uma queda na atividade da renina plasmática e nos níveis plasmáticos de Ang II com elevação persistente da pressão arterial. Nesta fase, as concentrações de Ang II vascular ou intrarenal podem desempenhar um importante papel no controle da neurotransmissão simpática (Figura2) (Pradhan & Rossi, 2013).

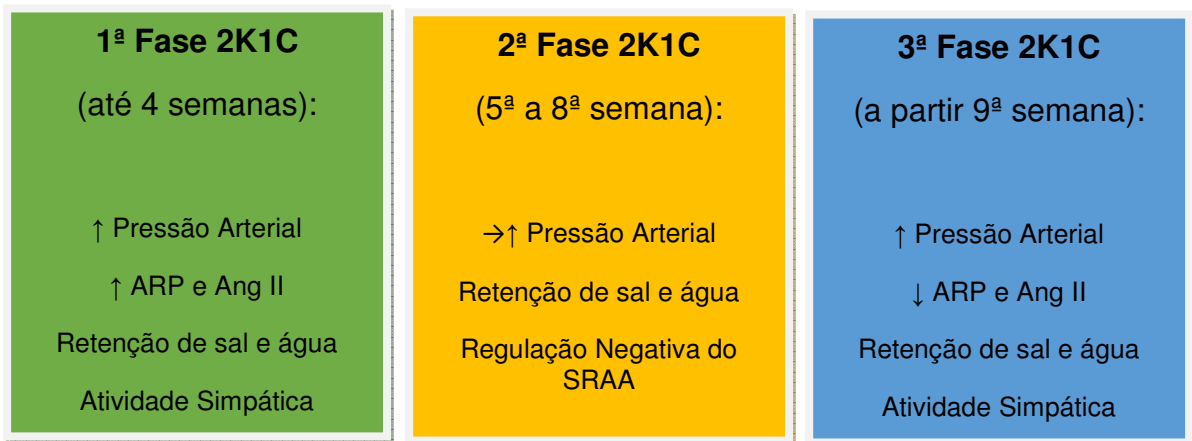


Figura 2: Representação esquemática das fases da hipertensão 2R1C (Pradhan & Rossi, 2013).

1.3 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

Cada vez mais, a hiperatividade do SRAA tem sido relacionada à gênese de várias doenças como a hipertensão arterial, o infarto agudo do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva, as arritmias cardíacas, o diabetes mellitus, a insuficiência renal crônica e o acidente vascular encefálico (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008). A cascata do SRAA se inicia com a produção de angiotensinogênio (Figura 3) principalmente por via hepática e renal, apesar de a maioria dos órgãos, incluindo o cérebro, a vasculatura, rins, coração e pulmões, também poderem produzir angiotensinogênio (Passos-Silva, Verano-Braga, Santos, 2013). Esse peptídeo não possui atividade intrínseca. Para tal, necessita sofrer duas modificações em sua estrutura: a primeira é a perda de dois aminoácidos, transformando-se num decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I), através da ação da enzima proteolítica renina (Santos et al., 2005), produzida pelas células justaglomerulares. A secreção de renina é regulada principalmente por quatro interdependentes fatores: (1) um mecanismo barorreceptor renal na arteríola aferente que detecta alterações na pressão de perfusão renal; (2) mudanças no transporte de cloreto de sódio (NaCl) para as células da mácula densa do túbulo distal; (3) estimulação do nervo simpático via receptores β_1 adrenérgicos, e (4) *feedback* negativo por uma ação direta da Ang II nas células justaglomerulares (Atlas, 2007). A renina e (pro)renina se ligam a uma proteína presente no mesângio glomerular e no subendotélio arterial conhecida como receptor de renina/(pro)renina igualmente, independente das suas atividades biológicas. A (pro)renina, que representa 70% a 90% do total de renina circulante, e a renina quando ligadas ao receptor induzem um aumento na eficiência catalítica do angiotensinogênio gerando Ang I, exercendo efeitos fisiológicos que são

independentes da Ang II, incluindo a estimulação da produção de colágeno e fibronectina (Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014).

A Ang I é um decapeptídeo de pouca ação biológica e através da ação de várias peptidases, especialmente PEP (prolil-endorpeptidase), NEP (endorpeptidase neutral) e TOP (thimet oligopeptidase), pode originar a angiotensina 1-7 (Ang1-7) que exerce sua ação através da ligação com o seu alvo específico: o receptor acoplado à proteína G Mas, produzindo diversos efeitos, como vasodilatação (podendo ser potencializada por bradicinina), efeito antiaritmogênico, melhora da função contrátil pós-infarto e inibição da proliferação celular (Santos et al., 2005; Passos-Silva, Verano-Braga, Santos, 2013). Além disso, a Ang I pode sofrer a ação da enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2) para formar angiotensina 1-9 (Ang1-9), a qual é subsequentemente clivado pela NEP ou ECA para formar Ang1-7. A Ang I também pode originar Ang II pela ação da quimase, catepsina A ou ECA (Figura 3). Esta última é produzida pelo endotélio pulmonar e demais tecidos (Millatt et al., 1999), que também metaboliza um número de outros peptídeos, incluindo os peptídeos vasodilatadores bradicinina e calidina em metabólitos inativos. Além disso, a Ang II pode ser produzida por outras vias independentes da ação da ECA, como catepsinas e quimases (Tonnesen et al., 1982; Weir et al., 1999). As vias não dependentes da ECA são responsáveis por cerca de 40% da geração de Ang II no rim humano intacto e a quimase é a via geradora de Ang II dominante no coração humano, artérias coronárias, e aorta aterosclerótica *in vitro* (Atlas, 2007).

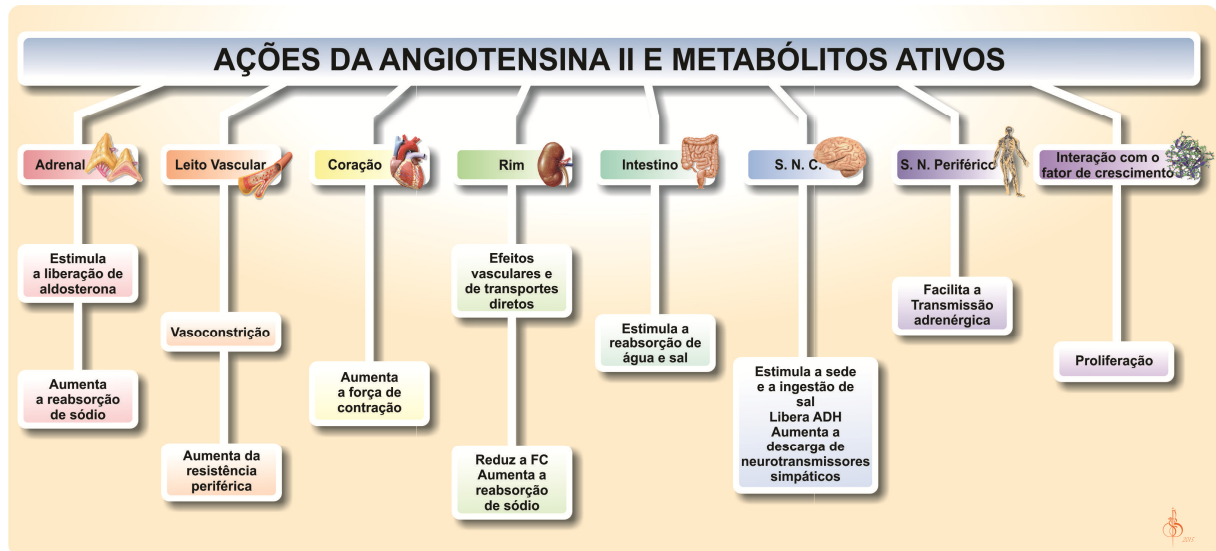


Figura 4: Ações sistêmicas da Angiotensina II sobre diferentes sistemas. Extraído e modificado de Navar et al., 1998.

Pelo menos quatro subtipos de receptores da Ang II foram descritos, dentre os quais se destacam os receptores do tipo 1 (AT_1) e 2 (AT_2) por serem os que apresentam ações mais elucidadas até o momento (Atlas, 2007).

O receptor AT_1 medeia ações sobre o sistema cardiovascular (vasoconstrição, aumento da pressão arterial, aumento da contratilidade cardíaca e vascular, com consequente hipertrofia cardíaca), no sistema renal (reabsorção de sódio e inibição da liberação de renina), no SNS e no córtex da supra-renal (estimulação da síntese de aldosterona). O receptor AT_1 também medeia efeitos da Ang II sobre o crescimento e proliferação celular, respostas inflamatórias e estresse oxidativo (Carey & Siragy, 2003; Ferrario, 2006).

O receptor AT_2 é abundante durante a vida fetal no cérebro, rins e outros tecidos, e os seus níveis diminuem acentuadamente no período pós-natal. Há algumas evidências de que, apesar de baixos níveis de expressão no adulto, o receptor AT_2 pode mediar a vasodilatação através da liberação de óxido nítrico (NO) e efeitos antiproliferativos e apoptóticos no músculo liso vascular, além de inibir o

crescimento e remodelamento cardíaco (Carey & Siragy, 2003; Stanton, 2003). No rim, tem sido proposto que a ativação de receptores AT_2 pode influenciar a reabsorção de sódio no túbulo proximal e estimular a conversão de prostaglandina E_2 renal a prostaglandina $F_{2\alpha}$ (Carey & Siragy, 2003; Ferrario, 2006).

A angiotensina III (Ang III) é um heptapeptídeo presente no sistema nervoso central (SNC), onde parece desempenhar um papel importante na manutenção tônica da pressão arterial e na hipertensão. Já a angiotensina IV (Ang IV) é um hexapeptídeo formado pela degradação enzimática da Ang III (Figura 3). Estudos pré-clínicos sugeriram uma cooperação de efeitos entre a Ang IV e a Ang II. Por exemplo, verifica-se que no cérebro a Ang IV atua no sentido de aumentar a pressão arterial, porém este efeito hemodinâmico requer a presença tanto da Ang II quanto de receptores AT_1 (Reudelhuber, 2005).

Como já mencionado anteriormente, a Ang II, via receptor AT_1 , também estimula a produção de aldosterona pela zona glomerular, a zona mais externa do córtex adrenal. A aldosterona é uma das principais substâncias responsáveis por regular o equilíbrio de sódio e de potássio e, assim, exercer um papel importante na regulação do volume extracelular, e conseqüentemente na pressão arterial. Ela reforça a reabsorção de sódio e água nos túbulos distais e ducto coletor e promove excreção de potássio e íons hidrogênio (Funder, 2002; Bader, 2010).

Novos peptídeos, enzimas e receptores com atividade biológica foram relatados como componentes do SRAA. O peptídeo angiotensina 1-12 (Ang1-12) foi identificado em roedores em 2006 como um peptídeo composto por 12 aminoácidos. Entre outros tecidos, ele é expresso no rim e no coração, atuando como um substrato para a formação de Ang I e Ang II, aparentemente independente da ação da renina. No entanto, também pode ser um precursor para Ang1-7. Para formar

Ang II e Ang1-7, a Ang1-12 sofre ação principalmente da ECA, mas também neprilisina e quimase. Adicionalmente, a Ang1-12 demonstrou ser capaz de se ligar aos receptores AT₁, sugerindo que, em algumas condições pode apresentar efeitos independentes do seu papel como um substrato para a formação de outros peptídeos da angiotensina (Etelvino, Peluso, Santos, 2014) (Figura 3).

Outro peptídeo recentemente descoberto foi a angiotensina A (Ang A), um octapeptídeo que apresenta a mesma afinidade da Ang II para receptores AT₁, embora tenha uma afinidade ligeiramente maior para receptores AT₂. A Ang A apresenta alta semelhança estrutural com a Ang II e produz efeitos dependentes dos receptores AT₁, tais como vasoconstrição, no entanto, estes efeitos são menos pronunciados que os provocados pela Ang II. Ainda devido à semelhança estrutural com a Ang II, a Ang A pode ser um substrato para ECA2 e forma alamandina, um heptapeptídeo endógeno presente tanto em tecidos cardíacos de rato quanto no plasma humano (Etelvino, Peluso, Santos, 2014). Alamandina também pode ser produzida diretamente a partir da Ang1-7 e inclusive possui várias ações semelhantes com as promovidas pela Ang1-7, incluindo vasodilatação, efeitos antifibróticos, antihipertensivos e centrais através da ligação ao receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas, membro D (MrgD). Este receptor é amplamente expresso em neurônios sensoriais nos gânglios da raiz dorsal, mas pode ser encontrado em outros órgãos, como testículo, bexiga, artérias, útero, cérebro, cerebelo, globo ocular, medula espinhal, traqueia, timo, coração, pulmão, diafragma, peritônio, trato gastrintestinal, músculo esquelético, próstata, vesícula seminal, e tecido adiposo branco e marrom. A Ang1-7 também é um fraco agonista do MrgD, no entanto, a alamandina não atua no receptor Mas (Lautner et al., 2013) (Figura 3).

Como a hiperatividade do SRAA apresenta íntima relação com a hipertensão arterial, pois o excesso de produção de Ang II é responsável, pelo menos em parte, pelo estabelecimento e desenvolvimento de hipertensão e lesão renal (Escobar et al., 2012), uma das principais ferramentas farmacológicas utilizadas clinicamente para o controle da hipertensão se baseia na inibição deste sistema, através de bloqueadores dos receptores da Ang II tipo 1 (BRAT₁), uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e recentemente, inibição da liberação de renina. Evidências epidemiológicas mostram que pacientes com hipertensão cujo SRAA está mais ativado apresentam maior risco de sofrer infarto do miocárdio (Alderman et al., 1991; Meade et al., 1993; Alderman, 1995; Laragh, 1995). Por outro lado, o tratamento de pacientes hipertensos com IECA e com BRAT₁, reduz a mortalidade e a incidência de infarto do miocárdio (Timmermans & Smith, 1996; Gavras, 1997).

Os IECA compõem uma classe de drogas que apresentam benefícios para uma variedade de doenças, incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, nefropatia diabética e outras formas de nefropatia (Cheung, 2002). Ao inibir a ECA, esses medicamentos minimizam a formação de Ang II e aumentam os níveis de bradicinina, promovendo seu efeito antihipertensivo (Gavras & Corcoran, 1994). Além de reduzir a pressão arterial, os IECA promovem regressão da hipertrofia ventricular (Dahlof et al., 1992), melhoram a disfunção endotelial (Mancini et al., 1996), diminuem a morbi-mortalidade associada à insuficiência cardíaca (Consensus, 1987), reduzem a mortalidade e melhoram a função cardíaca pós-infarto (Pfeffer et al., 1992) e reduzem a progressão da nefropatia diabética (Lewis et al., 1993). Estes marcantes sucessos dos IECA estimularam a busca por drogas alternativas para o bloqueio do SRAA, como o desenvolvimento dos BRAT₁, supondo que estas drogas bloqueariam os efeitos vasoconstritores da Ang II

mediados por seu receptor AT_1 de forma mais completa, específica e durável quando comparados aos IECA, uma vez que existem vias para formação da Ang II não dependentes da ECA. Como os $BRAT_1$ bloqueiam especificamente os receptores AT_1 , pode ocorrer estimulação exagerada dos receptores AT_2 , promovendo possivelmente um efeito vasodilatador, antiproliferativo e antiinflamatório (Horiuchi et al., 1999; Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014). O uso combinado destas duas classes de medicamentos oferece efeitos aditivos na redução da pressão arterial, da proteinúria na nefropatia e melhora do prognóstico na insuficiência cardíaca (Stergiou & Skeva, 2004).

Em 2007, a indústria farmacêutica Novartis introduziu no mercado um novo medicamento que atua inibindo o SRAA, o alisquireno. O alisquireno é um inibidor direto da renina, ativo por via oral, que atua através da ligação ao sítio ativo da renina. Este medicamento inibe diretamente a atividade da renina plasmática, o passo inicial e limitante no SRAA (Lizakowski, Tylicki, Rutkowski, 2013). O desenvolvimento de inibidores de renina foi difícil devido à baixa biodisponibilidade por via oral e custos elevados desses medicamentos (Persson, Rossing, Parving, 2012). Diversos estudos clínicos têm demonstrado que o alisquireno é eficaz na diminuição da pressão arterial em pacientes com hipertensão arterial leve a moderada (Musini et al., 2008; Verdecchia et al., 2010; Zhu et al., 2012; Chen et al., 2013; Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014) e previne e/ou melhora a resistência à insulina, a disfunção endotelial aórtica e o remodelamento vascular em ratos hipertensos alimentados com frutose (Chou et al., 2013).

O alisquireno é pouco absorvido, com biodisponibilidade oral de 2,5%, e atinge concentrações plasmáticas máximas dentro de 1-3 horas após administração oral. As concentrações plasmáticas no estado estacionário são alcançadas 5-8 dias

após o início da administração oral. Após uma dose oral única de 300 mg, o alisquireno apresentou uma meia-vida de eliminação de 40 horas em voluntários saudáveis. Houve pouco ou nenhum efeito abaixo de 75 mg.dia⁻¹, e nenhum efeito adicional para reduzir a pressão arterial com doses acima de 300 mg.dia⁻¹. A maioria dos efeitos sobre a pressão arterial ocorreu após 2 semanas do início do tratamento, e um efeito máximo foi observado após 4 semanas. A excreção é quase completamente pela via fecal (91,5%), com 77,5% da dose excretada na forma inalterada. Alisquireno, em contraste com IECA e BRAT₁, diminui a atividade da renina plasmática em aproximadamente 50-80% e também reduz os níveis plasmáticos de Ang I e Ang II, mas aumenta fortemente as concentrações de renina e (pro)renina (Lizakowski, Tylicki, Rutkowski, 2013; Angeli et al., 2014).

O fato da renina ser a primeira enzima envolvida na cascata enzimática do SRAA e ter notavelmente alta especificidade por apenas um substrato, o angiotensinogênio, era esperado que o alisquireno apresentasse alta eficácia antihipertensiva com menores efeitos colaterais do que os IECA, pois a ECA tem muitos substratos peptídicos, incluindo a bradicinina, que quando é acumulada é responsável por promover um dos principais efeitos colaterais observados com estes medicamentos, a tosse (Friedrich & Schmieder, 2013; Angeli et al., 2014). Por outro lado, o aumento da concentração plasmática de renina que ocorre numa extensão maior com o uso do alisquireno do que com o uso de IECA ou BRAT₁, pode ser um problema importante, visto que a (pro)renina e renina parecem estimular o receptor de renina/(pro)renina e induzir fibrose, apoptose e hipertrofia de órgãos em animais experimentais. No entanto, o significado clínico deste achado ainda não está claro (Danser, 2009). Até o momento, os estudos clínicos realizados em pacientes com hipertensão que usavam alisquireno demonstraram que este medicamento

apresentava segurança e tolerabilidade semelhantes a BRAT₁ sendo que a dor de cabeça, diarreia, tonturas, fadiga, e dor nas costas são os efeitos adversos mais descritos, porém numa frequência similar ao grupo placebo (Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014).

O alisquireno pode ser utilizado em monoterapia ou associado a outro bloqueador do SRAA ou um diurético. Como monoterapia, alisquireno demonstrou ser eficaz em reduzir albuminúria e proteinúria e demonstra ser uma alternativa útil quando a terapia com um IECA ou BRAT₁ é ineficaz ou pouco tolerada. Em associação com IECA ou BRAT₁, alisquireno pode aumentar o bloqueio sobre o SRAA e ser utilizado em pacientes com proteinúria em que a monoterapia não é suficientemente eficaz. No entanto, esta associação deve ser cuidadosamente monitorizada devido ao risco de desenvolvimento de hipercalemia e deterioração da função renal, e deve ser evitado em pacientes com diabetes ou insuficiência renal (Lizakowski, Tylicki, Rutkowski, 2013). Um estudo realizado em pacientes hipertensos demonstrou que a associação do alisquireno com hidroclorotiazida (diurético tiazídico) apresentou uma maior eficácia na redução da pressão arterial do que a monoterapia (Villamil et al., 2007). Este tipo de evidência forneceu a base para que o alisquireno passasse a ser comercializado em doses fixas associado a este diurético.

1.4 O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO

O cérebro desempenha papel chave na regulação da pressão arterial via mecanismos baroreflexos e por alterações crônicas no tônus simpático, em particular

na atividade do nervo simpático renal (ANSR) (Rossi et al., 2010). As fibras simpáticas que inervam os rins se originam principalmente do plexo celíaco e suas subdivisões, os nervos esplâncnicos lombares e o gânglio mesentérico superior (Pradhan & Rossi, 2013). Os nervos renais estão localizados aproximadamente no entroncamento da aorta abdominal e artéria renal, entrando no hilo em associação com a artéria e a veia renal (Dibona & Rios, 1980).

A descarga do nervo simpático renal é sincronizada, e consiste em picos de atividade, sendo que a duração do pico depende do grau de sincronização do disparo de fibras nervosas ativas. Já o intervalo entre os disparos depende do ritmo central que são influenciados pela entrada dos reflexos periféricos, como os barorreflexos cardíacos e arteriais (Dibona, 2000). Os picos sincronizados renais simpáticos podem ser caracterizados por sua amplitude, duração ou frequência. Mudanças na ANSR podem ocorrer devido a alterações na amplitude ou na frequência, ou em ambos. A amplitude é influenciada pelo número de fibras dos nervos renais ativadas, enquanto a duração do pico é influenciada pelo disparo sincronizado e dispersão da massa de descarga devido a diferentes velocidades de condutância das múltiplas fibras do nervo renal. Já a frequência dos picos é reflexo do ritmo das descargas sincronizadas (Dibona & Jones, 1998; Dibona, 2000).

Os nervos renais apresentam fibras eferentes simpáticas, importantes na regulação da função renal, e fibras aferentes que transmitem informações sensitivas dos rins para o SNC. Sinais gerados em receptores sensoriais renais e conduzidos via nervo aferente renal modificam a atividade nervosa simpática eferente com consequências para a regulação da pressão arterial (Grisk & Rettig, 2004). Em resposta a múltiplas estimulações centrais e periféricas, a atividade eferente simpática do nervo renal é alterada, transmitindo informações via sinapse química

para os vasos, glomérulos e túbulos (Dibona & Kopp, 1992; Dibona & Kopp, 1997). Tem sido mostrado que existe uma interação mútua entre ANSR eferente e aferente, sendo que o aumento da atividade simpática aferente diminui a atividade simpática eferente, resultando em natriurese (conhecido como reflexo renorenal), que ajuda a limitar a retenção de sódio, e dessa forma, regular a pressão arterial (Pradhan & Rossi, 2013).

A hiperatividade do SNS tem sido implicada no desenvolvimento e manutenção da hipertensão essencial e renovascular em humanos (Esler, 1995; Esler, 2000; Johansson et al., 1999; Burke, Evans, Head, 2010; Hogarth et al., 2007; Xu et al., 2011). Estudos em modelos animais de hipertensão mostram um aumento na ANSR basal, bem como um aumento da concentração plasmática de noradrenalina em cães com hipertensão 2R1C e no sangue venoso renal do rim estenótico de pacientes com hipertensão renovascular (Katholi et al., 1982; Grisk & Rettig, 2004; Burke & Head, 2009). Essa excessiva atividade nervosa simpática desempenha um papel patogênico no desencadeamento e na manutenção da hipertensão renovascular, assim como na progressão dos danos aos órgãos, especialmente nos rins e coração (Katholi et al., 1982; Harrison et al., 2010; Carlstrom, 2010; Grassi, 2012).

No rim normal, os nervos simpáticos são responsáveis por regular a absorção tubular de sal e água diretamente, assim como através da modulação da atividade do SRAA. Em particular, as alterações na ANSR influenciam hormônios, como a Ang II, que afetam a função renal e a excreção urinária de água e sal, sendo de extrema importância no controle do fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular (TFG), influenciando o volume extracelular e a pressão arterial a longo prazo (DiBona & Kopp, 1997; Salomonsson, Brannstrom, Arendshorst, 2000; Rossi

et al., 2010). Na hipertensão renovascular tem sido observado que os quimiorreceptores renais são ativados por oclusão da artéria renal, aumentando a ANSR que, por sua vez, ativam o SRAA (Pradhan & Rossi, 2013). Dessa forma, assim como a ANSR é capaz de ativar o SRAA e influenciar na liberação de Ang II, a Ang II circulante pode contribuir para a elevada atividade simpática na hipertensão renovascular por sua ação sobre o SNC ou por ativação de neurônios simpáticos pós-ganglionares devido à supressão do reflexo inibitório renorenal (Ma, Abboud, Chapleau, 2001; Dendorfer et al., 2002; Kopp, Cicha, Smith, 2003). Os efeitos do SRAA na atividade simpática também são evidentes em pacientes com hipertensão renovascular, uma vez que a dilatação da artéria renal estenótica reduz não só a atividade da renina plasmática, mas também ANSR (Miyajima et al., 1991).

O mecanismo para ativação dos nervos renais na hipertensão renovascular é complexo e pouco esclarecido. Nervos renais aferentes se projetam para núcleos regulatórios no SNC, como o órgão subfornical e tronco cerebral, incluindo o núcleo do trato solitário e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), onde os sinais são integrados e os sinais simpáticos eferentes são transmitidos para a medula espinhal através da coluna intermediolateral e neurônios pré-ganglionares simpáticos do rim contralateral (Pradhan & Rossi, 2013).

O RVLM é a região mais importante na gênese e na modulação da atividade simpática eferente (Barman, 1984; Ross et al., 1984; Guyenet, 1985). Sua destruição acarreta queda na pressão arterial e interfere nas funções reflexas cardiovasculares, uma vez que seus neurônios respondem indiretamente a estimulação dos barorreceptores aórticos e carotídeos, e de receptores sensoriais renais (Ciriello & Calaresu, 1983). O RVLM contém neurônios pré-motores simpáticos, enviando projeções monossinápticas para a coluna intermediolateral

tóraco-lombar, onde se localizam os neurônios pré-ganglionares simpáticos. Esses neurônios pré-ganglionares simpáticos são os elementos de saída (via final) para a geração do tônus simpático para o coração, vasos de resistência e medula adrenal (Campos et al., 2001).

Diante da importância da ANSR no controle da pressão arterial, ressalta-se a denervação simpática ou a inibição da ativação simpática como uma importante intervenção terapêutica que visa à redução da elevada pressão arterial e a correção ou retardamento dos processos patológicos responsáveis pelas complicações da hipertensão (McBryde, 2007; Ishimitsu, 2009; Hausberg & Tokmak, 2013; Rodrigues et al., 2013; Bohm et al., 2014; Hu et al., 2014; Gouvea et al., 2014). Além disso, o efeito positivo da diminuição da ANSR foi associado com uma tendência em aumentar o fluxo sanguíneo e melhorar a condutância vascular no rim clipado de ratos 2R1C (Burke, Evans, Head 2010), pois os nervos renais são conhecidos por produzirem vasoconstrição renal, embora em níveis mais elevados de ANSR do que os que são requeridos para liberar renina (Burke, Evans, Head 2010).

1.5 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA HIPERTENSÃO

É bem conhecido que o desequilíbrio na produção dos fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio promovem alterações na função endotelial e aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Cannon III, 1998; Triggle, 2003). O endotélio vascular é um tecido capaz de controlar importantes funções nos vasos, incluindo a regulação do tônus vascular, angiogênese, processos proliferativos, prevenir a agregação plaquetária e

resposta inflamatória e imune (Félétou & Vanhoutte, 2009). A regulação do tônus e da estrutura de vasos de condutância e de resistência acontece por meio da liberação contínua de vários mediadores vasoativos, como o NO, espécies reativas de oxigênio (EROs), endotelina-1, Ang II, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, prostaciclina e ácidos epoxieicosatrienóicos (Meyrelles, et al., 2011). Dentre os componentes vasodilatadores do endotélio, o NO é um dos mais importantes participantes, sendo um componente fundamental na manutenção da homeostase dos vasos (Moncada et al., 1991; Cannon III, 1998).

O NO é um radical livre inorgânico altamente reativo em estado gasoso, o que o permite se difundir facilmente pelas membranas celulares mediando múltiplas funções em nosso organismo. O NO via parácrina ou autócrina, está envolvido no relaxamento do músculo liso vascular, diminuição da agregação plaquetária, sinalização celular, aprendizado, além de respostas imunológicas citotóxicas (Nathan & Xie, 1994; Loscalzo, 2001). O NO é sintetizado a partir do aminoácido básico L-arginina, simultaneamente com a L-citrulina (Figura 4). Para isso, é indispensável a ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual é representada por 3 isoformas: NOS neuronal (nNOS ou tipo I) descrita inicialmente em tecidos neuronais, NOS induzível (iNOS ou tipo II) encontrada em macrófagos e NOS endotelial (eNOS ou tipo III) identificada em células endoteliais. É importante lembrar que a atividade enzimática requer também a participação de cofatores como calmodulina (CaM), tetrahydrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídio (FAD), flavina mononucleotídio (FMN) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), fundamentais para uma correta síntese de NO (Michel & Feron, 1997). As enzimas nNOS e eNOS são expressas constitutivamente e são dependentes de Ca⁺²-calmodulina (Lowenstein & Snyder, 1992; Kiechele & Malinski, 1993). O

aumento de Ca^{+2} em resposta a agonistas vasodilatadores ou tensão de cisalhamento desloca o inibidor caveolina da calmodulina, ativando eNOS e nNOS (Davignon & Ganz, 2004). Apenas a iNOS é expressa de forma induzível e não é dependente de Ca^{+2} -calmodulina (Marletta, 1993).

O mecanismo de ação intracelular do NO é comum para as três isoformas: inicialmente ocorre a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, aumentando assim a conversão da guanosina monofosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (GMPc). Após a formação deste 2º mensageiro, a proteína quinase G (PKG) é ativada acarretando uma diminuição citosólica de Ca^{+2} em células do músculo liso vascular, induzindo assim a uma resposta celular do NO, promovendo finalmente a uma ação vasodilatadora (Moncada et al., 1991., Cannon III., 1998) (Figura 5).

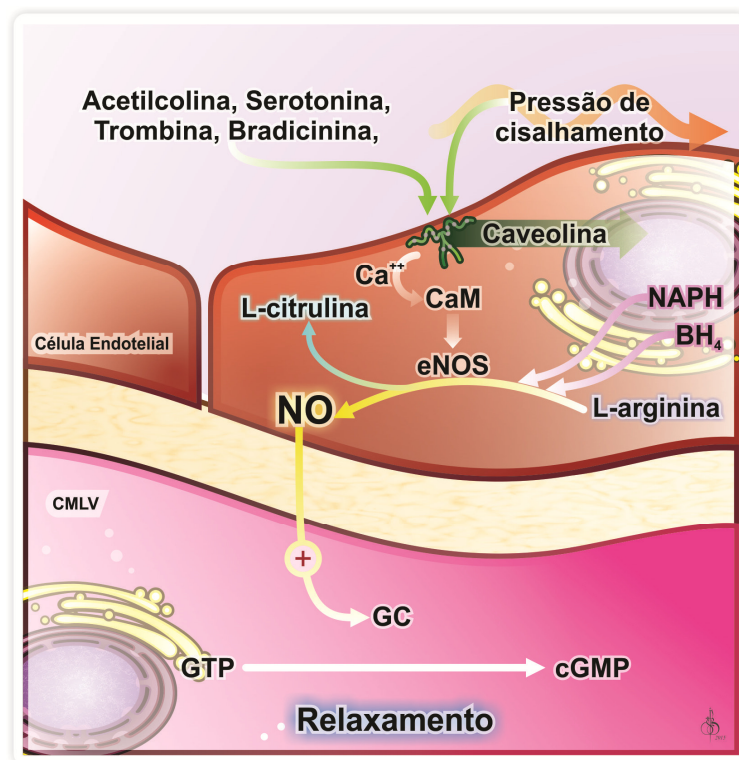


Figura 5: Via de formação e mecanismo de ação do óxido nítrico (NO). Extraído e modificado de Davignon & Ganz, 2004.

O NO é uma molécula com função ampla no tecido renal, sendo a mais importante molécula vasodilatadora no rim (Majid & Navar, 2001). O NO promove vasodilatação na arteríola aferente, aumentando a TFG e inibe a reabsorção de sódio ao longo do néfron (Juncos et al., 1995; Gabbai & Blantz, 1999; Ortiz & Garvin, 2002). Adicionalmente, o NO regula o transporte iônico em vários segmentos do néfron (Ortiz & Garvin, 2002). Mesmo em condições basais, as três isoformas de NOS se encontram distribuídas em vários tipos de células renais: a nNOS é expressa na mácula densa, arteríolas aferentes e eferentes, nervos renais, glomérulo, ducto coletor, alça de Henle ramo descendente e em toda microvasculatura renal (Bachmann et al., 1994; Kone, 1997; Kone & Baylis, 1997; Patzak et al., 2004). Bachmann et al. (1994) afirmam que a nNOS é a isoforma mais abundante no tecido renal e sua presença na mácula densa sugere que o NO possa modular a secreção de renina pelo aparato justaglomerular e pelo *feedback* tubuloglomerular (Schnackenberg et al., 1997; Millatt et al., 1999). Quanto a iNOS, esta isoforma no rim também é constitutivamente expressa por células mesangiais (Ahn et al., 1994). A eNOS é encontrada no leito vascular renal e também é expressa no epitélio tubular (Tojo et al., 2002).

O desenvolvimento da hipertensão está bem documentado em animais com bloqueio crônico da síntese de NO ou animais knockout para o gene NOS, enquanto que a reversão da hipertensão também é verificada em camundongos que superexpressam o gene NOS (Gava et al., 2008). Convém salientar que existem outros mecanismos contribuindo para a hipertensão e injúria de órgãos em quadros de deficiência de NO. Neste caso, sugere-se que tanto a Ang II quanto endotelina também contribuam para manutenção da hipertensão e para lesões cardio-renais (Schiffrin et al., 1999).

Devido à relevância em reestabelecer a função endotelial para impedir a hipertensão e seus danos aos órgãos, vários estudos têm investigado os efeitos do precursor do NO, L-arginina (L-ARG), em diferentes modelos de hipertensão (Harrison, 2010; Carlstrom, 2010; Gouvea et al., 2003; Campos et al., 2011), na intenção de que a administração exógena de L-ARG pudesse, por meio de um aumento na produção de NO, restaurar a disfunção endotelial e reduzir a pressão arterial, apresentando resultados na hipertensão renovascular (Kopp, Jones, DiBona, 2008). Corroborando esses achados, estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que os animais com hipertensão renovascular que receberam L-ARG tiveram uma redução nos níveis hipertensores da ordem de 25 % após sete dias de tratamento. Além do efeito sistêmico sobre a pressão arterial, a L-ARG promoveu diurese e natriurese nos hipertensos tratados, reverteu a hipertrofia cardíaca, aumentou a massa do rim clipado e reduziu significativamente a atividade da ECA no plasma, coração e rim cuja artéria renal recebeu o clipe (Gouvea et al., 2003; Gouvea et al., 2004). Dessa forma, evidências apontam o tratamento com L-ARG como promissor não somente na redução da hipertensão arterial 2R1C, mas, sobretudo, na proteção de órgãos-alvo. Outro estudo demonstrou que a L-ARG é capaz de aumentar a produção de NO na circulação renal (Ackermann et al., 1998).

Tem sido postulado que os principais fatores no desenvolvimento da hipertensão 2R1C são um aumento da Ang II e a disfunção endotelial. Sugere-se que uma deficiente produção de NO derivado do endotélio resulte em uma diminuição do tônus vasodilatador, permitindo um aumento da resistência vascular, e isso contribui para a elevada pressão sanguínea (Sigmon & Beierwaltes, 1998). Além disso, na hipertensão renovascular existe um aumento da produção de radicais livres principalmente devido a ação da Ang II vascular (Goodfriend *et al.*, 1996).

Níveis elevados de EROs podem levar ao aumento de resistência das artérias, pois diminuem a biodisponibilidade de NO por peroxidação de lipídeos de membrana, causando prejuízo no relaxamento e promovendo a proliferação de células do músculo liso (Klima et al., 2013). Em diferentes modelos de hipertensão animais e também em humanos hipertensos observaram-se que as EROs são mediadores importantes responsáveis pela disfunção endotelial (Martínez-Revelles et al., 2013). Dessa forma, vários mecanismos poderiam justificar os benefícios do tratamento com L-ARG na hipertensão renovascular, principalmente o aumento na formação de NO no rim, facilitando a reperfusão renal, cardíaca e promovendo vasodilatação sistêmica.

2 JUSTIFICATIVA

Existe uma significativa taxa de morbidade e mortalidade associada à hipertensão renovascular, uma condição que muitas vezes apresenta difícil controle. No passado, a hipertensão resistente associada com estenose da artéria renal era tratada com cirurgia de revascularização renal. No entanto, isto foi associado com alta mortalidade e morbidade, com um estudo mostrando uma taxa de mortalidade de 10%. Isto levou a uma mudança a favor de intervenções baseadas em cateter percutâneo ao invés dos cirúrgicos, mas o tratamento da hipertensão renovascular com a revascularização também tem sido decepcionante, com risco substancial de complicações graves, incluindo mortes e amputações de membros inferiores (Pradhan & Rossi, 2013). Em vista desta dificuldade, há um interesse cada vez maior em compreender plenamente os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão renovascular a fim de desenvolver terapias mais seguras e eficientes, como o tratamento farmacológico.

Sabe-se que o principal mediador da hipertensão renovascular é o SRAA, com consequente disfunção endotelial, levando a danos nos principais órgãos-alvo da hipertensão como o coração e os rins. No entanto, o papel da ANSR em produzir e manter elevada a pressão arterial por meio da modulação da secreção de renina e da reabsorção tubular renal de sódio, contribuindo para a progressão dos danos teciduais é cada vez mais reconhecido (Pradhan & Rossi, 2013). Portanto, medicamentos que sejam capazes de bloquear o SRAA, restaurar a disfunção endotelial e que ainda sejam capazes de diminuir a ANSR seriam importantes para reduzir a hipertensão e suas consequências neste modelo experimental. Diante

disto, escolhemos um medicamento que atua bloqueando o SRAA, o alisquireno (ALSK), e o aminoácido L-ARG, precursor da síntese do principal vasodilatador derivado do endotélio, o NO, para avaliar seus efeitos isolados e associados sobre a pressão arterial, a atividade simpática renal e função renal em ratos com hipertensão renovascular, o que poderia trazer uma nova proposta no tratamento da hipertensão renovascular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar os efeitos do alisquireno e L-arginina administrados de maneira isolada ou associada no controle da pressão arterial, da atividade simpática renal e da função renal, além de avaliar a reversão e/ou prevenção das consequências cardíacas e renais desencadeadas pela hipertensão renovascular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Verificar o efeito do tratamento isolado e associado com alisquireno e L-arginina sobre a pressão arterial sistólica de ratos com hipertensão renovascular;
- b)** Analisar a atividade simpática renal basal e a responsividade simpática frente às drogas vasoativas fenilefrina e nitroprussiato de sódio em ratos com hipertensão renovascular tratados com alisquireno e L-arginina;
- c)** Avaliar o efeito do tratamento isolado e associado do alisquireno e L-arginina sobre o fluxo sanguíneo renal, a taxa de filtração glomerular e a excreção urinária de água, sódio, cloreto e uréia de ratos com hipertensão renovascular;
- d)** Analisar a expressão protéica das isoformas neuronal, induzível e endotelial da óxido nítrico sintase nos rins clipados e não-clipados de ratos com hipertensão renovascular tratados com alisquireno e L-arginina;

- e) Analisar o peso dos ventrículos e dos rins de ratos com hipertensão renovascular tratados com alisquireno e L-arginina.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, pesando entre 150-170 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno com água filtrada e ração *ad libitum* sob condições de controle de temperatura, luminosidade e ciclo de 12 horas claro/escuro.

O cuidado e uso desses animais experimentais estavam de acordo com as diretrizes do NIH, e todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes para a pesquisa biomédica como declarado pelas Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental e foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 004/2010).

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Tratamento

Os ratos foram divididos de maneira aleatória em cinco grupos experimentais (n= 8 por grupo): SHAM (normotensos controle, água por gavagem, 0,3 mL); Dois-rins-um-clipe (2R1C; hipertensos controle, água por gavagem, 0,3 mL); Dois-rins-um-clipe tratados com alisquireno (Rasilez®; Novartis, Itália) (2R1C ALSK;

alisquireno $50 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ diluído em água, por gavagem, $0,3 \text{ mL}$); Dois-rins-um-clipe tratados com L-arginina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (2R1C L-ARG; L-arginina $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ diluído em água, por gavagem, $0,3 \text{ mL}$) e Dois-rins-um-clipe tratados com alisquireno associado à L-arginina (2R1C ALSK+L-ARG; alisquireno $50 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e L-arginina $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, diluídos em água, por gavagem, $0,3 \text{ mL}$).

Todos os tratamentos foram iniciados após sete dias do procedimento cirúrgico para produção da hipertensão 2R1C, com duração de vinte e um dias consecutivos, totalizando 28 dias de hipertensão renovascular (Figura 6).

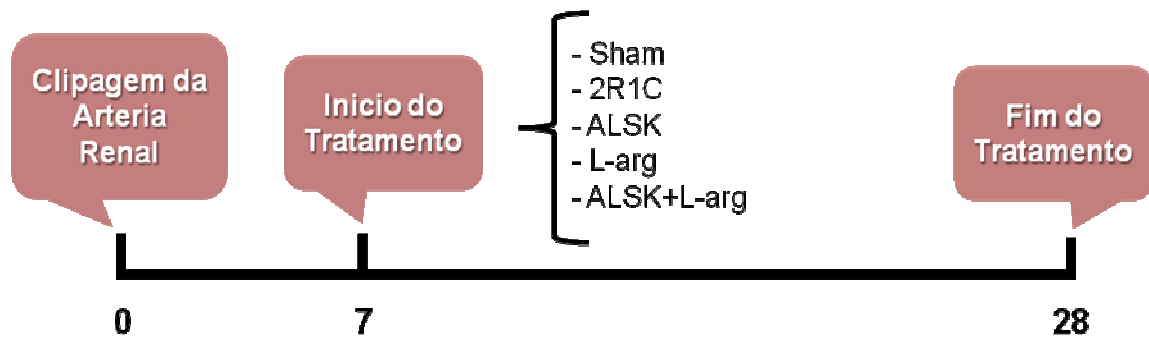


Figura 6: Organograma do protocolo experimental

4.2.2 Produção da Hipertensão Renovascular 2R1C

A hipertensão renovascular foi induzida pelo método desenvolvido por Goldblatt (2R1C). Sob anestesia intraperitoneal com cetamina (80 mg.kg^{-1}) e xilazina (5 mg.kg^{-1}), foi realizada tricotomia, com posterior assepsia com álcool à 70% na região mediana e do flanco direito do animal. Foi realizada uma incisão no flanco direito com exposição do pedúnculo renal. A artéria renal foi isolada da veia renal e posteriormente colocado um clipe de prata pré-calibrado com um grau de constrição equivalente ao diâmetro interno de $0,2 \text{ mm}$ na artéria renal direita do animal para

indução da hipertensão renovascular (2R1C). Após o procedimento, a incisão foi suturada e o animal foi acondicionado em gaiolas individuais e mantido no biotério sob observação constante durante sete dias. Os ratos SHAM foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com manipulação da artéria renal direita, porém não foi implantado o clipe de prata. O critério de inclusão para a hipertensão, no presente estudo, foi uma pressão arterial sistólica (PAS) maior que 160 mmHg após sete dias da cirurgia.

4.2.3 Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica

A medida indireta da PAS foi realizada por pletismografia de cauda (IITC Life Science— 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA) em todos os grupos com os animais conscientes, no tempo zero (antes do procedimento cirúrgico para produção da hipertensão renovascular), após sete dias do procedimento cirúrgico e após 21 dias de tratamento (28 dias de pós-operatório). Os ratos foram previamente adaptados ao pletismógrafo e sua PAS medida diariamente por pelo menos 5 dias antes da mensuração, e, assim, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. A média de três medidas foi utilizada. Para validar os valores obtidos por pletismografia, no final do tratamento, os ratos foram cateterizadas para aferição direta da PAS.

4.2.4 Análise da medida direta da pressão arterial sistólica

Inicialmente o animal era colocado em uma cuba de vidro contendo algodão hidrófilo embebido em halotano 3% (Cristália, Itapira, SP, Brasil) para a indução anestésica por inalação.

Foi realizada tricotomia com posterior incisão cutânea de aproximadamente 1cm na linha mediana ventral da região inguinal esquerda, próximo a virilha do animal, com a finalidade de expor a veia e a artéria femoral esquerda, e da região cervical dorsal interescapular do animal para exteriorização dos catéteres. Em seguida era canulada a artéria e veia femoral, inserindo um cateter de polietileno PE-10 acoplado previamente a outro cateter PE-50, preenchidos com solução de salina-heparina (100:1/UI) tendo o seu comprimento ajustado de acordo com o tamanho do animal. Esses cateteres eram exteriorizados no dorso do animal com o auxílio de um trocáter para permitir o registro da PAS nos animais não anestesiados e com livre movimentação. Após 12 horas da implantação dos cateteres, foi realizada a medida direta da PAS dos animais através da conexão da cânula inserida na artéria femoral a um transdutor de pressão (Viggo-Spectramed, P23XL) que por sua vez estava conectado a um amplificador (Pressure Processor, Gould 20-4615) e registrado em um polígrafo (Gould RS 3400) previamente calibrado.

4.2.5 Análise da função renal e estimativa da massa dos rins e ventrículos

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas nas últimas 24 horas do protocolo experimental para coleta da urina a fim de monitorizar o equilíbrio eletrolítico, o fluxo urinário e a taxa de filtração glomerular (TFG). As concentrações urinárias de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), ureia e creatinina foram

realizadas usando um fotômetro de chama (Instrumental Laboratories, modelo 943). A TFG foi determinada pela depuração da creatinina conforme descrito por Gracelli et al. (2013) e calculado como $(V \times Ucr)/Pcr$, onde V é o fluxo urinário ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$), Ucr é a concentração de creatinina na urina ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), e Pcr é a concentração plasmática de creatinina ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

No final do experimento, os animais foram decapitados, e uma amostra de sangue foi retirada para medir a creatinina plasmática. Os rins e os ventrículos foram removidos, desencapsulados e pesados, e foram determinadas as proporções do peso do ventrículo esquerdo (VE), do ventrículo direito (VD) e dos rins cliado (RC) e não-cliado (RNC) em função do peso corporal final do animal (peso VE, VD ou rim/peso corporal final).

4.2.6 Registro da atividade do nervo simpático renal

Inicialmente o animal era colocado em uma cuba de vidro contendo algodão hidrófilo embebido em halotano para a indução anestésica por inalação. Esses animais eram então fixados em decúbito dorsal a uma mesa cirúrgica e mantidos sob anestesia por inalação para que fosse possível a canulação da veia femoral, e posteriormente, era administrado o anestésico geral uretana, (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) lentamente por via intravenosa (i.v.) até atingir a dose de $1,2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Esse anestésico promove apenas uma pequena depressão dos reflexos cardiovasculares e respiratórios do animal, mantendo um plano anestésico estável por um longo período (Maggi & Meli, 1986).

Pequenas doses suplementares de uretana eram administradas durante a realização do experimento, sempre que necessário, a fim de manter o nível

anestésico ideal. O plano anestésico, por sua vez, foi avaliado por meio de reflexos da córnea e o reflexo de retirada.

Após atingir um plano anestésico satisfatório, o animal foi colocado em decúbito lateral direito para uma incisão retro-peritoneal no flanco esquerdo. Para isso, foi feita uma abertura abaixo da costela e acima da crista ilíaca superior, na região lombar. As membranas foram retiradas, assim como a fáscia tóraco-lombar até que fossem alcançados os músculos espinhais, que por sua vez foram desprendidos da coluna lombar, afastando-os até que fossem visualizados os órgãos retroperitoneais, em particular o rim esquerdo. Este, então, foi afastado das demais estruturas com auxílio de um afastador cirúrgico, expondo o nervo renal, localizado aproximadamente no entroncamento da artéria aorta abdominal e artéria renal.

O nervo foi dissecado sob amplificação de 16 a 32X (microscópio cirúrgico Zeiss), e colocado sobre um eletrodo de prata. Adicionava-se óleo mineral (Nujol) para evitar o ressecamento e movimentação do nervo. Os potenciais de ação extracelulares foram registrados em um amplificador (NL 104, Neurolog, Digitimer). Os sinais amplificados foram filtrados (NL 126), conectados a um amplificador de áudio (NL 120) e a atividade elétrica do nervo observada no osciloscópio (Tektronix 2205). Os dados foram digitalizados (Acqknowledge for Windows; Biopac Inc.) e armazenados no disco rígido de um computador.

Após a estabilização hemodinâmica do animal, registrava-se a ANSR basal. Para avaliar a capacidade de resposta simpática a drogas vasoativas, fenilefrina (FE, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, 8 mg.kg⁻¹, i.v.) foi injetada em cada animal para obter uma taquicardia reflexa e inibição da atividade simpática típicas. Após injeção

de FE, aguardava-se 30 minutos e aplicava-se nitroprussiato de sódio (NPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, $25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.v.). Da mesma forma, o NPS desencadeou uma bradicardia reflexa e simpatoexcitação. Depois de administrar FE ou NPS, a atividade do nervo renal foi registrada como a diferença (Δ) em relação ao valor basal (apresentado imediatamente antes da injeção das drogas). A ANSR basal foi calculada como uma percentagem do máximo de ANSR ($\text{ANSR antes do NPS} / \text{ANSR máxima após NPS} \times 100\%$) (Liu et al., 1999).

Também foi registrada a pressão arterial média (PAM) dos animais anestesiados através da conexão da cânula inserida na artéria femoral a um transdutor de pressão (Viggo-Spectramed, P23XL) que por sua vez estava conectado a um amplificador (Pressure Processor, Gould 20-4615) e registrado em um polígrafo (Gould RS 3400) previamente calibrado. Através da canulação da artéria femoral também foi possível registrar a frequência cardíaca (FC) por meio de um frequencímetro (Biotach, Gould 13-64615), previamente calibrado, a partir da onda de pulso da pressão arterial.

Durante todo o experimento, a temperatura retal foi mantida entre 37-37.5°C com uma manta de aquecimento controlada por termostato (Harvard).

4.2.7 Expressão protéica da nNOS, iNOS e eNOS

4.2.7.1 Preparação dos rins e quantificação de proteínas

As amostras foram preparadas utilizando os rins clipado e não-clipado de todos os grupos estudados. Os rins foram coletados no final do protocolo experimental, lavados com solução de TBS gelada e mantidos a -80°C até o

momento da homogeneização, que foi realizada em 6000 μ L de tampão de homogeneização (10mM Tris – HCl pH 7,4, 1mM NaVO₃, 1% SDS, 0,5mM DTT, 5 mM EDTA, 1mM PMSF), ao qual se adicionou 1:100 de coquetel de inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de um homogeneizador, sendo seguida de centrifugação a 3500 rpm, a 4°C por 30 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80 °C.

A quantificação do conteúdo de proteína total nos rins foi realizada utilizando-se o método de Lowry (Lowry, 1951). Preparou-se o reagente A (48:1:1 – carbonato de sódio 3% com 0,1 M de NaOH, tartarato de sódio/potássio 4% e sulfato de cobre 2%, respectivamente) e o reagente B (reagente de Folin-fenol Ciocalteu – 1:3 em água). A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão, em que as diluições continham de 10 a 100 μ g de proteína. Alíquotas dos sobrenadantes dos homogenatos dos rins foram diluídas 10 vezes e desta diluição foram retirados 25 μ L para realização do método de Lowry, a fim de evitar extrapolação dos pontos ‘padrão’ e perda de linearidade. Todos os tubos de ensaio foram completados com água para um volume final de 250 μ L, sendo posteriormente adicionados 2,5 mL da solução A. Após 10 minutos, se adicionou 0,25 mL da solução B. A absorbância foi medida a 660 nm após 10 minutos. Todas as dosagens foram feitas em duplicata e realizadas as médias entre as mesmas.

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 μ g de proteína, sendo este volume balanceado com tampão de homogeneização para um volume final igual para todas as amostras. Após balancear todas as amostras, foi acrescentado o mesmo volume de solução de Laemmli (0,5 mM de uréia, 0,17 mM

de SDS, 39 μ M de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%). As amostras depois de preparadas eram aquecidas a 95°C durante 5 minutos.

4.2.7.2 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 7,5% para iNOS e 10% para eNOS e nNOS (1,5 M Tris-SDS (0,1%) pH 8,6, bis/acrilamida 30%, APS 10% e Temed). A eletroforese foi conduzida com o tampão de corrida (25 mM de tris base pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), a 80 volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura).

4.2.7.3 Transferência das proteínas

As proteínas das amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando um sistema de transferência semi-dry (Biorad, Trans-Blot SD), com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris base pH 8,0, 192 mM de glicina, 10% SDS e 20% (v/v) de metanol, por 55 minutos a 10 volts. Para isso, foi montado um “sanduíche” composto por papel Whatman, membrana de PVDF previamente ativada, gel e papel Whatman (Figura 7). Para ativar a membrana de PVDF foi necessário mergulhá-las em metanol puro por 5 minutos (em mesa agitadora), e em seguida no tampão de transferência gelado por 10 minutos. A membrana, após a transferência, era congelada a -20°C para posterior incubação dos anticorpos.

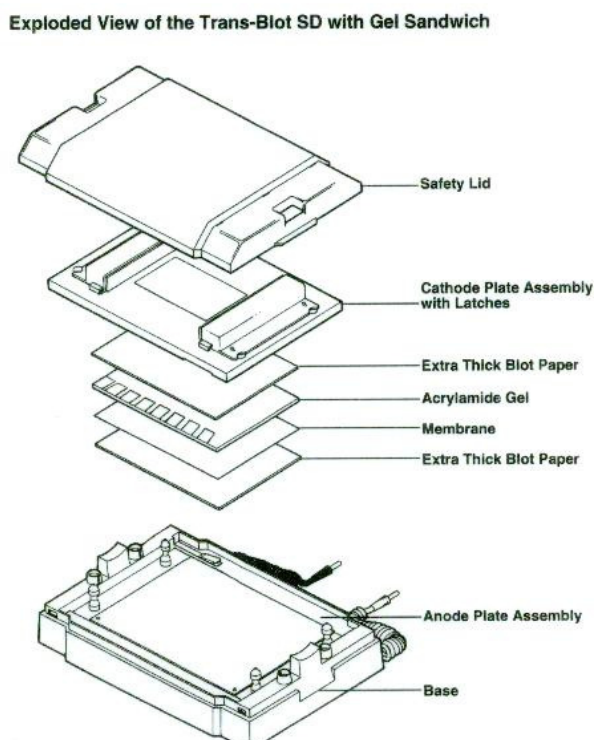


Figura 7: Esquema representativo do método de transferência das proteínas.

4.2.7.4 Incubação dos anticorpos

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite em pó Molico desnatado (5%) em tampão TBS-tween (10 mM de tris base pH 7,4, 100 mM de NaCl e 0,1% de tween 20) à temperatura ambiente sob agitação leve, para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente por 5 minutos, 6 vezes, e então incubadas com anticorpos primários por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação, diluídos em TBS-T e 5% de BSA. As seguintes diluições dos anticorpos primários foram utilizadas: eNOS (1:2500, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK), iNOS (1:2500, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK), nNOS (1:250,

Santa Cruz Biotechnology, Inc) e para β -actina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase alcalina – 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluído em TBS-T + Leite 5% (Molico Desnatado) por 1:30 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1% por 5 minutos, 6 vezes, e posteriormente com tampão TBS por 10 minutos, 3 vezes.

4.2.7.5 Revelação

As membranas foram incubadas até o surgimento das bandas (de 10 a 30 minutos) com a solução de revelação NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – Invitrogen) para detecção da ligação proteína-anticorpo. Posteriormente, as membranas tiveram suas imagens digitalizadas e tratadas utilizando o programa ImageJ (*domínio público*). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β -actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As alterações da função renal, da ANSR e da expressão das proteínas foram analisadas por ANOVA uma via para comparação de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Para a expressão de proteínas, os dados foram expressos como a razão entre as densidades de imunotransferência correspondente à proteína de interesse e β -actina. Os valores foram expressos como Média \pm EPM. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO 2R1C

No início do estudo (dia 0), antes da cirurgia para implantação do clipe na artéria renal, os valores de PAS foram semelhantes em todos os grupos experimentais, mas foram aumentados uma semana após a colocação do clipe (dia 7) de maneira semelhante em todos os ratos 2R1C em comparação com ratos SHAM. Após 21 dias de tratamento (dia 28), o grupo 2R1C ALSK+L-ARG diminuiu a PAS 29,8% em comparação com ratos não tratados 2R1C, apresentando valores semelhantes ao grupo SHAM. O tratamento com ALSK também foi capaz de induzir uma diminuição de 7,07% (15,4 mmHg) na PAS, em comparação com ratos 2R1C. Uma redução de 11,09% (21,9 mmHg) na PAS foi observada no grupo 2R1C L-ARG, em comparação com ratos 2R1C. Este resultado demonstra que a monoterapia foi menos eficaz do que a combinação das drogas (Tabela 1).

No intuito de validar os dados obtidos por pletismografia, ao final do protocolo experimental, os animais foram cateterizados e foi aferida a pressão arterial sistólica direta nos ratos acordados. A PAS direta demonstrou valores semelhantes aos obtidos por pletismografia de cauda no final do tratamento (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK+L-ARG) sobre a pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

	SHAM	2R1C	2R1C ALSK	2R1C L-ARG	2R1C ALSK+L-ARG
PAS dia 0	119,2±2,5	117,6±3,7	115,8±3,5	121,8±2,2	117,2±2,3
PAS dia 7	120,2±3,6	204,4±12,7*	217,8±10,2*	197,5±8,9*	197,14±6,1*
PAS dia 28	114,4±5,2	196,8±6,8*	202,4±17,7*	175,6±9,1*	138,4±4,4 ^{#+}
PAS direta	108,3±5,2	198,3±13,4*	198,7±9,1*	167,9±13,5*	140,8±9,7 ^{#+}

Valores expressos como média ± EPM; (n = 8 por grupo). PAS aferida nos dias 0, 7 e 28 foram mensuradas por pletismografia de cauda e a PAS direta por cateterização da artéria femoral. *P <0,05 em relação ao grupo SHAM; #P <0,05 em relação ao grupo 2R1C; +P <0,05 em relação ao grupo 2R1C ALSK.

5.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE O PESO DO CORAÇÃO E DOS RINS

O tratamento com ALSK não é capaz de impedir a atrofia promovida pela hipertensão renovascular no rim clipado em comparação com o grupo 2R1C, no entanto, o tratamento com L-ARG, de maneira isolada ou associada ao ALSK, demonstrou valores semelhantes ao grupo SHAM (SHAM: 4,1±0,17; 2R1C: 2,3±0,31; 2R1C ALSK: 2,1±0,35; 2R1C L-ARG: 3,4±0,21; 2R1C ALSK+L-ARG: 3,1±0,28 mg.g⁻¹) (Figura 8A), e, da mesma forma, os rins não-clipados dos animais dos grupos 2R1C e 2R1C ALSK eram mais pesados do que os dos outros grupos experimentais (SHAM: 4,1±0,17; 2R1C: 6,1±0,5; 2R1C ALSK: 6,1±0,82; 2R1C L-ARG: 4,3±0,33; 2R1C ALSK+L-ARG: 4,0±0,36 mg.g⁻¹) (Figura 8B). Apenas os ratos 2R1C ALSK+L-ARG apresentaram valores semelhantes ao grupo SHAM para o peso de ambos os rins clipado e não-clipado.

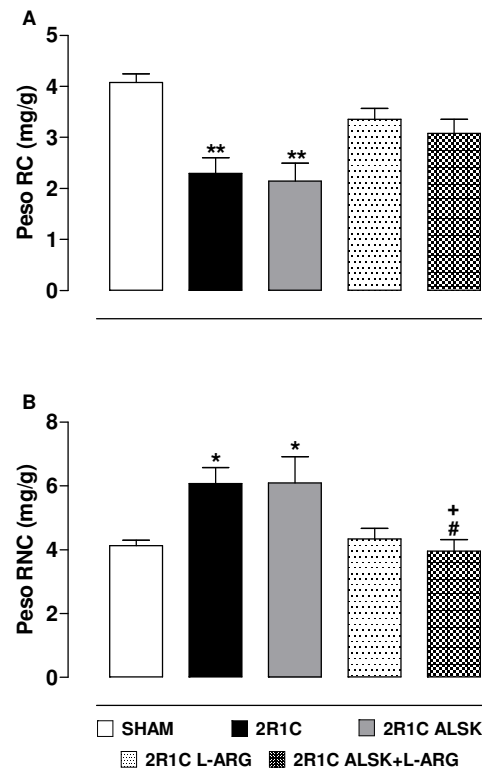


Figura 8: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre o peso dos rins clipados (RC) (A) e não-clipados (RNC) (B) em ratos 2R1C. ** P <0,01 e * P <0,05 em relação ao grupo SHAM; #P <0,05 em relação ao grupo 2R1C; + P <0,05 em relação ao grupo 2R1C ALSK.

Além disso, a hipertensão renovascular promoveu hipertrofia do VE nos grupos 2R1C e 2R1C ALSK, e somente os animais tratados com L-ARG ou a associação ALSK+L-ARG não apresentaram hipertrofia do VE, pois os valores não diferiram do grupo SHAM (SHAM: $2,2 \pm 0,04$; 2R1C: $3,3 \pm 0,17$; 2R1C ALSK: $2,7 \pm 0,14$; 2R1C L-ARG: $2,2 \pm 0,14$; 2R1C ALSK+L-ARG: $2,4 \pm 0,25$ mg.g⁻¹) (Figura 9A). O peso do VD não demonstrou diferenças significantes entre os grupos estudados (SHAM: $0,56 \pm 0,03$; 2R1C: $0,6 \pm 0,04$; 2R1C ALSK: $0,62 \pm 0,07$; 2R1C L-ARG: $0,55 \pm 0,04$; 2R1C ALSK+L-ARG: $0,66 \pm 0,07$ mg.g⁻¹) (Figura 9B).

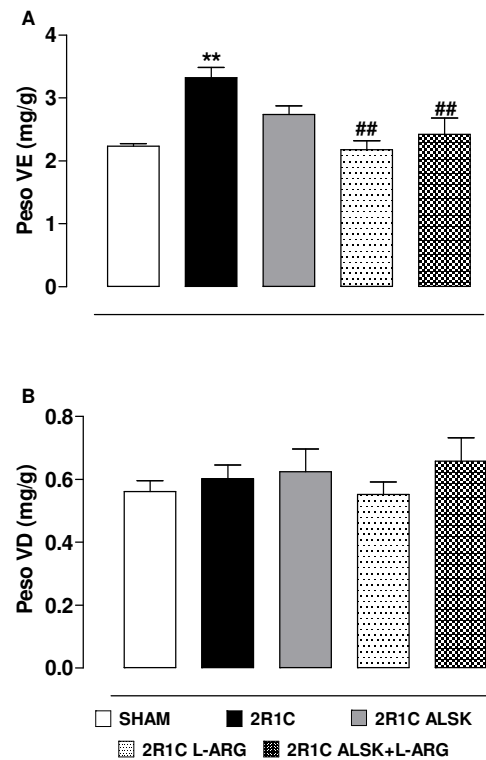


Figura 9: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre o peso do ventrículo esquerdo (VE) (A) e do ventrículo direito (VD) (B) em ratos 2R1C. ** $P < 0,01$ em relação ao grupo SHAM; ## $P < 0,01$ em relação ao grupo 2R1C.

5.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A ATIVIDADE DO NERVO SIMPÁTICO RENAL

A hipertensão 2R1C aumentou a ANSR basal, calculada como uma porcentagem do máximo de ANSR, conforme descrito em Materiais e Métodos (SHAM: $62,4 \pm 6,39$ vs 2R1C: $97,4 \pm 8,43$ %). O tratamento com ALSK não foi capaz de diminuir a ANSR basal (2R1C ALSK: $84,2 \pm 2,5$ %), no entanto, o tratamento com L-ARG e a associação ALSK+L-ARG reduziu de forma significativa a ANSR basal (2R1C L-ARG: $70,7 \pm 2,39$; 2R1C ALSK+L-ARG: $69,3 \pm 4,23$ %) (Figura 10). Além disso, as respostas simpáticas à injeção de FE e NPS foram diminuídas nos grupos

2R1C, 2R1C ALSK e 2R1C L-ARG em comparação com os ratos SHAM, e apenas o grupo 2R1C ALSK+L-ARG foi capaz de restaurar a responsividade simpática para valores semelhantes ao grupo SHAM (% Δ FE em SHAM: $-57,1 \pm 5,40$; 2R1C: $-24,7 \pm 3,60$; 2R1C ALSK: $-30,3 \pm 2,48$; 2R1C L-ARG: $-33,9 \pm 3,92$; 2R1C ALSK+L-ARG: $-55,4 \pm 6,36\%$ e % Δ NPS em SHAM: $78,1 \pm 13,21$; 2R1C: $12,6 \pm 3,37$; 2R1C ALSK: $21,4 \pm 3,67$; 2R1C L-ARG: $38,4 \pm 3,33$; 2R1C ALSK+L-ARG: $49,2 \pm 8,79$) (Figura 11).

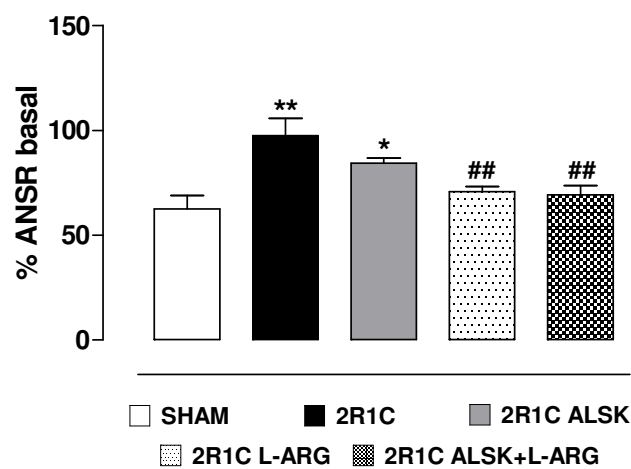


Figura 10: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a atividade do nervo simpático renal (ANSR) basal em ratos 2K1C. ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ comparado com SHAM; ## $P < 0,01$ comparado com 2R1C.

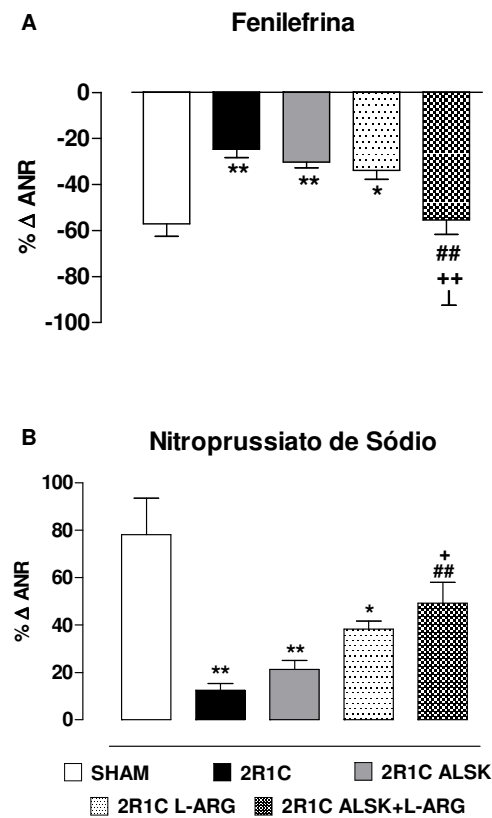


Figura 11: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a atividade do nervo simpático renal (ANSR) em ratos 2R1C após injeção de fenilefrina (FE) e nitroprussiato de sódio (NPS). ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ comparado com o grupo SHAM; ## $P < 0,01$ comparado com 2R1C; ++ $P < 0,01$ e + $P < 0,05$ comparado com 2R1C ALSK; ⊥ $P < 0,01$ comparado com 2R1C L-ARG.

Vale ressaltar que não houve diferença na PAM e na FC entre os grupos estudados ao administrar as drogas vasoativas FE e NPS, demonstrando que a dose empregada dessas drogas foi capaz de promover o mesmo nível de alteração nesses parâmetros (Tabela 2).

Tabela 2: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) após injeção de fenilefrina (FE) e nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

	SHAM	2R1C	2R1C ALSK	2R1C L-ARG	2R1C ALSK+L-ARG
Δ PAM com FE	58 \pm 4,8	61 \pm 4,2	58 \pm 2,8	54 \pm 3,4	53 \pm 3,3
Δ FC com FE	-40 \pm 8,1	-53 \pm 7,8	-54 \pm 10	-50 \pm 11,5	-49 \pm 9,7
Δ PAM com NPS	-49 \pm 4,9	-70 \pm 6,9	-64 \pm 6,8	-68 \pm 3,6	-65 \pm 7,2
Δ FC com NPS	23 \pm 3,7	18 \pm 5,1	12 \pm 7,3	16 \pm 4,0	14 \pm 2,9

Valores expressos como média \pm EPM; (n = 8 por grupo).

5.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A FUNÇÃO RENAL

Para avaliar a função renal nos ratos com hipertensão renovascular, a concentração de ureia plasmática, o fluxo urinário, a TFG e a excreção urinária de água, Na⁺, K⁺, Cl⁻ e ureia foram medidos.

A ureia plasmática foi aumentada nos grupos 2R1C e 2R1C ALSK. O tratamento com L-ARG, isolado ou associado ao ALSK, reduziu esses valores (SHAM: -52,0 \pm 4,07; 2R1C: 84,8 \pm 4,23; 2R1C ALSK: 80,8 \pm 10,58; 2R1C L-ARG: 50,0 \pm 6,57; 2R1C ALSK+L-ARG: 55,6 \pm 4,72 mg.dL⁻¹) (Figura12).

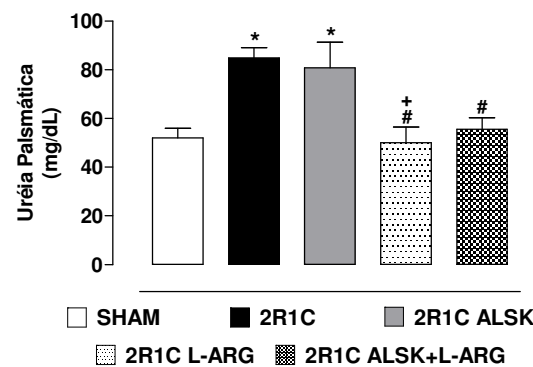


Figura 12: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a concentração de ureia plasmática em ratos 2R1C. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SHAM; # $P < 0,05$ comparado com 2R1C; + $P < 0,05$ comparado com 2R1C ALSK.

A excreção de Na^+ , Cl^- e ureia foram diminuídas em ambos os grupos 2R1C e 2R1C ALSK em comparação com ratos SHAM enquanto os grupos 2R1C L-ARG e 2R1C ALSK + L-ARG apresentaram valores semelhantes ao grupo SHAM (excreção de Na^+ em SHAM: $148,0 \pm 14,1$; 2R1C: $48,2 \pm 7,9$; 2R1C ALSK: $48,5 \pm 9,2$; 2R1C L-ARG: $120,6 \pm 8,2$; 2R1C ALSK+L-ARG: $129,8 \pm 4,5$ mEq/dia; excreção de Cl^- em SHAM: $273,8 \pm 27,01$; 2R1C: $123,6 \pm 21,81$; 2R1C ALSK: $133,7 \pm 29,50$; 2R1C L-ARG: $241,8 \pm 12,81$; 2R1C ALSK+L-ARG: $279,8 \pm 37,57$ mEq/dia; excreção de ureia em SHAM: $3408 \pm 538,3$; 2R1C: $1288 \pm 282,1$; 2R1C ALSK: $1287 \pm 81,1$; 2R1C L-ARG: $4399 \pm 14,3$; 2R1C ALSK+L-ARG: $4234 \pm 425,5$ mg.dL⁻¹). Por outro lado, a excreção de K^+ foi aumentada apenas em ratos 2R1C, sendo que todos os tratamentos foram capazes de normalizar esse parâmetro (excreção de K^+ em SHAM: $59,9 \pm 6,25$; 2R1C: $127,4 \pm 12,4$; 2R1C ALSK: $54,8 \pm 6,33$; 2R1C L-ARG: $78,3 \pm 12,2$; 2R1C ALSK+L-ARG: $49,4 \pm 2,57$ mEq/dia) (Figura 13).

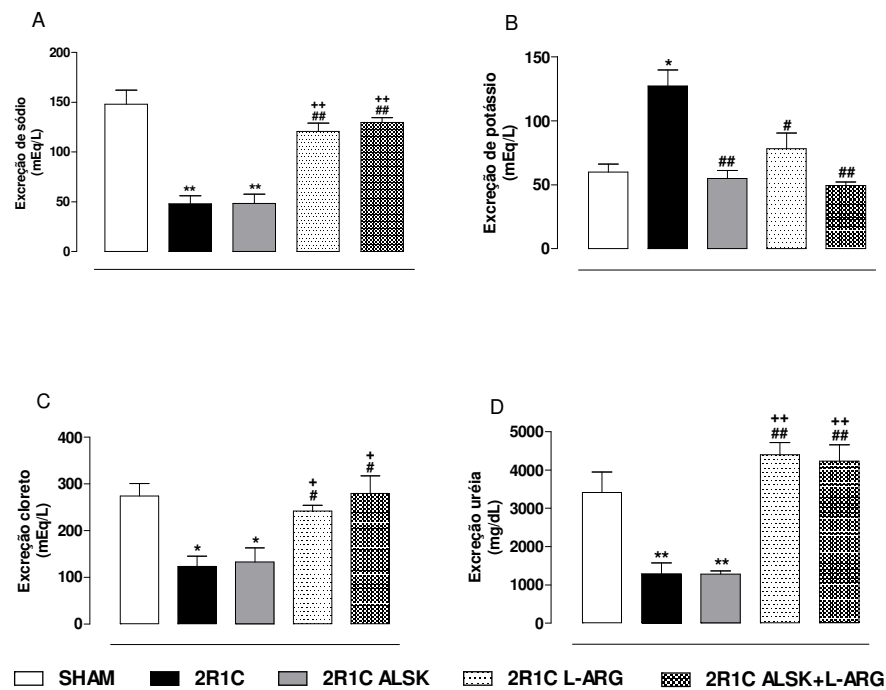


Figura 13: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a excreção de sódio (Na^+ , em A), potássio (K^+ , em B), cloreto (Cl^- , em C) e ureia (D) em ratos 2R1C. ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ comparado com o grupo SHAM; ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ comparado com 2R1C; ++ $P < 0,01$ e + $P < 0,05$ comparado com 2R1C ALSK.

A excreção de água e o fluxo de urina foram significativamente reduzidos em ambos os grupos 2R1C e 2R1C ALSK em comparação com ratos SHAM. A administração de L-ARG ou ALSK+L-ARG aumentou de maneira significativa o fluxo urinário (Volume de excreção em SHAM: $20,0 \pm 2,04$; 2R1C: $11,1 \pm 0,57$; 2R1C ALSK: $9,1 \pm 1,04$; 2R1C L-ARG: $16,7 \pm 3,24$; 2R1C ALSK+L-ARG: $14,0 \pm 2,23 \text{ mL.dia}^{-1}$; Fluxo urinário em SHAM: $0,014 \pm 0,0004$; 2R1C: $0,007 \pm 0,0002$; 2R1C ALSK: $0,006 \pm 0,0005$; 2R1C L-ARG: $0,012 \pm 0,002$; 2R1C ALSK+L-ARG: $0,011 \pm 0,0002 \text{ mL.min}^{-1}$) (Figura 14 A e B, respectivamente).

A hipertensão renovascular promoveu uma redução da TFG e o tratamento com L-ARG de maneira isolada ou associada ao ALSK aumentou esse parâmetro,

mas o mesmo não ocorreu com a monoterapia com ALSK, (SHAM: $1,06 \pm 0,19$; 2R1C: $0,285 \pm 0,03$; 2R1C ALSK: $0,37 \pm 0,04$; 2R1C L-ARG: $1,3 \pm 0,13$; 2R1C ALSK+L-ARG: $1,09 \pm 0,16$ mL.min⁻¹) (Figura 14 C).

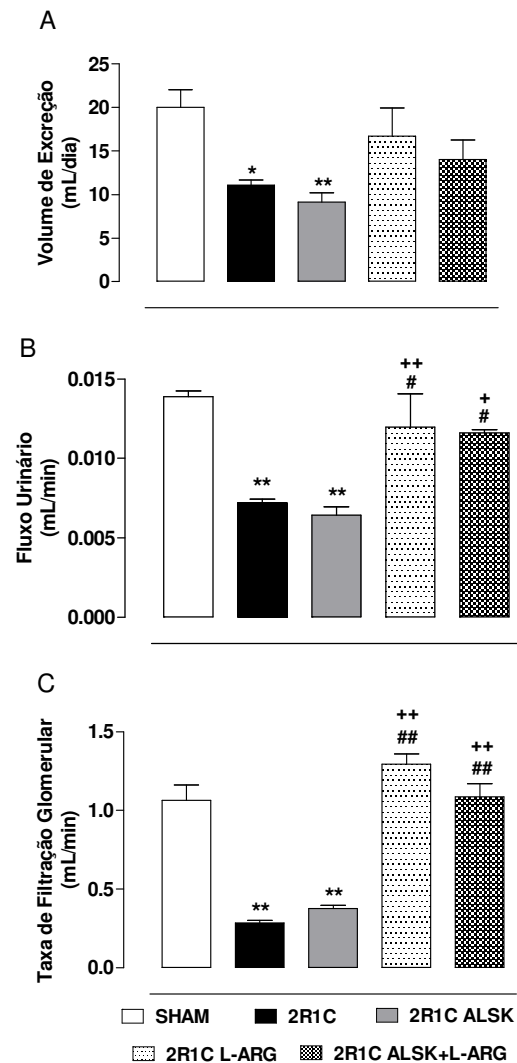


Figura 14: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre o volume de excreção (A), fluxo urinário (B) e taxa de filtração glomerular (C) em ratos 2R1C. ** P <0,01 e * P <0,05 comparado com o grupo SHAM; ## P <0,01 e # P <0,05 comparado com 2R1C; ++ P <0,01 e + P <0,05 comparado com 2R1C ALSK.

5.5 EXPRESSÃO DA nNOS, iNOS E eNOS NO RIM CLIPADO E NÃO-CLIPADO DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Houve um aumento significativo da expressão de nNOS no rim clipado dos ratos 2R1C L-ARG em comparação com ratos SHAM e 2R1C (SHAM: $0,65 \pm 0,14$; 2R1C: $0,68 \pm 0,07$; 2R1C ALSK: $1,08 \pm 0,25$; 2R1C L-ARG: $1,58 \pm 0,23$; 2R1C ALSK+L-ARG: $1,13 \pm 0,34$ U.A.) (Figura 15 A). No rim não-clipado, a expressão de nNOS foi significativamente diminuída em ratos 2R1C em relação ao grupo SHAM e aumentada nos grupos 2R1C L-ARG e 2R1C ALSK+L-ARG em comparação com ratos 2R1C (SHAM: $1,36 \pm 0,24$; 2R1C: $0,59 \pm 0,15$; 2R1C ALSK: $1,00 \pm 0,24$; 2R1C L-ARG: $1,67 \pm 0,27$; 2R1C ALSK+L-ARG: $1,25 \pm 0,12$ U.A.) (Figura 15 B).

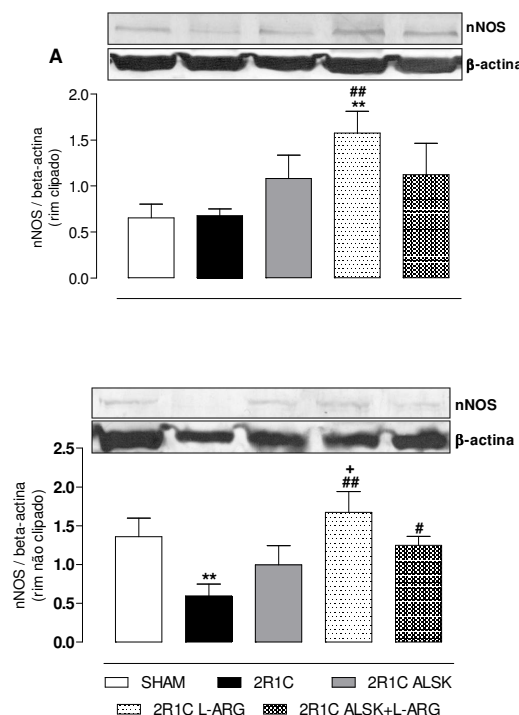


Figura 15: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a expressão protéica de nNOS no rim clipado (A) e no rim não-clipado (B) de ratos 2R1C. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como uma relação entre a densidade das bandas de nNOS e da β actina. ** $P < 0,01$ comparado com o grupo SHAM; ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ comparado com 2R1C; + $P < 0,05$ comparado com 2R1C ALSK.

A expressão da iNOS no rim clipado foi aumentada nos animais 2R1C quando comparado com ratos SHAM, mas não houve diferença dos demais grupos em relação ao SHAM (SHAM: $0,74 \pm 0,12$; 2R1C: $1,47 \pm 0,30$; 2R1C ALSK: $1,17 \pm 0,27$; 2R1C L-ARG: $1,04 \pm 0,18$; 2R1C ALSK+L-ARG: $0,88 \pm 0,13$ U.A.) (Figura 16 A). No rim não-clipado, a expressão da iNOS foi aumentada nos ratos 2R1C e 2R1C L-ARG em comparação com todos os outros grupos (SHAM: $0,38 \pm 0,14$; 2R1C: $1,12 \pm 0,15$; 2R1C ALSK: $0,38 \pm 0,06$; 2R1C L-ARG: $1,04 \pm 0,11$; 2R1C ALSK+L-ARG: $0,39 \pm 0,06$ U.A.) (Figura 16 B).

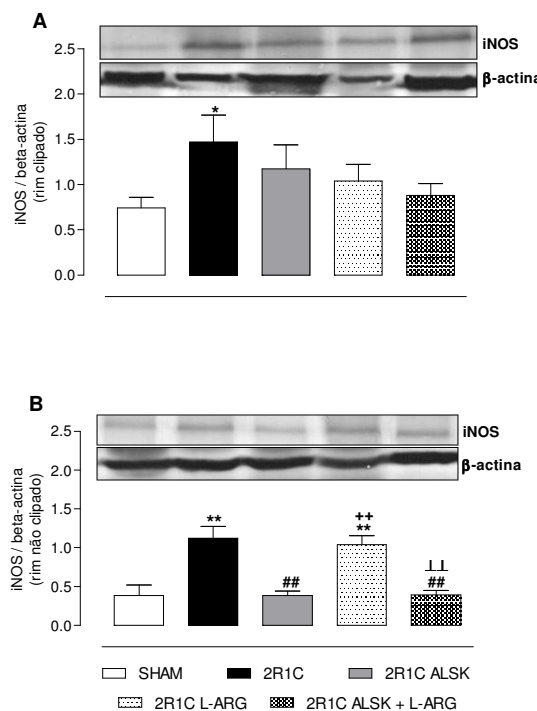


Figura 16: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a expressão protéica de iNOS no rim clipado (A) e no rim não-clipado (B) de ratos 2R1C. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como uma relação entre a densidade das bandas de iNOS e da β actina. ** $P < 0,01$ comparado com o grupo SHAM; ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ comparado com 2R1C; + $P < 0,05$ comparado com 2R1C ALSK.

A expressão de eNOS no rim clipado foi reduzida em ratos 2R1C em comparação com o grupo SHAM e foi aumentada em ratos 2R1C L-ARG em comparação com 2R1C, 2R1C ALSK e 2R1C ALSK+L-ARG (SHAM: $0,92 \pm 0,20$; 2R1C: $0,43 \pm 0,09$; 2R1C ALSK: $0,71 \pm 0,14$; 2R1C L-ARG: $1,29 \pm 0,20$; 2R1C ALSK+L-ARG: $0,72 \pm 0,07$ U.A.) (Figura 17 A). No entanto, não houve diferença significativa na expressão de eNOS no rim não-clipado entre os diferentes grupos (SHAM: $0,87 \pm 0,05$; 2R1C: $0,90 \pm 0,10$; 2R1C ALSK: $1,02 \pm 0,15$; 2R1C L-ARG: $1,11 \pm 0,05$; 2R1C ALSK+L-ARG: $0,85 \pm 0,07$ U.A.) (Figura 17 B).

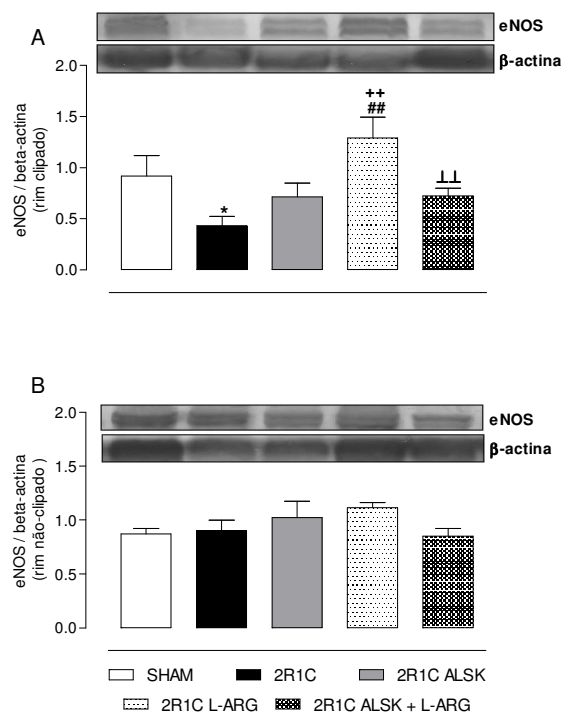


Figura 17: Efeito do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e da associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a expressão protéica de eNOS no rim clipado (A) e no rim não-clipado (B) de ratos 2R1C. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como uma relação entre a densidade das bandas de eNOS e da β actina. ** P <0,01 comparado com o grupo SHAM; ## P <0,01 e # P <0,05 comparado com 2R1C; + P <0,05 comparado com 2R1C ALSK.

6 DISCUSSÃO

Nosso presente estudo forneceu três novas descobertas importantes que são relevantes para a consideração do uso da associação de ALSK+L-ARG para a farmacoterapia do tratamento da hipertensão renovascular. O primeiro achado foi uma significativa redução da pressão arterial após 21 dias de tratamento, atingindo valores estatisticamente semelhantes ao grupo SHAM. O segundo achado foi uma normalização da ANSR e uma maior responsividade simpática. O terceiro achado foi restauração da função renal através da análise do fluxo renal, TFG e da excreção urinária de água, Na^+ , K^+ , Cl^- e ureia.

As abordagens atuais para o tratamento farmacológico da hipertensão renovascular são problemáticas (Mancia et al., 2007). Recomendações européias incluem antagonistas de canais de cálcio e diuréticos com a possível adição de um bloqueador do SRAA (Mancia et al., 2007). Estes últimos medicamentos, que incluem IECA, BRAT_1 e inibidores de renina, como o ALSK, parecem ser os mais eficazes no tratamento da hipertensão renovascular, mas há um risco significativo de insuficiência renal aguda que limita a sua aplicabilidade clínica (Spence, 2002; Burke, Evans, Head, 2009). Assim, existe uma necessidade de explorar terapias alternativas, como os fármacos simpato-inibidores. Nesse sentido, nosso trabalho aponta para uma importante ferramenta farmacológica para o controle da pressão arterial na hipertensão renovascular.

Durante a fase inicial da hipertensão 2R1C, a patogênese da doença tem sido atribuída a uma combinação de elevada Ang II, volume plasmático alterado, alterações na função renal e aumento da atividade do nervo renal. Portanto, o

bloqueio do SRAA promovido pela inibição da renina com o uso do ALSK poderia contribuir para a redução da hipertensão no modelo renovascular estudado. No entanto, nossos resultados mostraram que a monoterapia com ALSK não foi capaz de reduzir a PAS, apesar de estudos em humanos terem demonstrado uma redução da pressão arterial de indivíduos com doença renal crônica (Chen et al., 2013) e em pacientes com hipertensão arterial leve a moderada (Musini et al., 2008; Verdecchia et al., 2010; Zhu et al., 2012; Chen et al., 2013; Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014). Contudo, não podemos refutar a hipótese de que uma dose mais elevada da monoterapia com ALSK do que a utilizada neste trabalho ou um tratamento mais prolongado poderia evocar queda da pressão arterial, como demonstrado no estudo desenvolvido por Hermanowicz et al. (2013) que utilizou ALSK nas doses de 10, 30 e 100mg.kg⁻¹.dia⁻¹ por 10 dias em ratos 2R1C e só obteve redução da PAS com a maior dose, e ainda no estudo desenvolvido por Martins-Oliveira et al. (2013) que utilizou a mesma dose do ALSK (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹) e observou que após 3 semanas de tratamento, a PAS não foi reduzida, porém após 4 semanas houve uma redução significativa da PAS dos ratos 2R1C. Adicionalmente, estudos demonstram que o efeito hipotensor do ALSK é potencializado quando utilizado em combinação com diuréticos ou outros bloqueadores do SRAA (Yoshitomi, 2013). Por outro lado a monoterapia com L-ARG é capaz de reduzir a PAS, mas não normalizar, conforme observado neste estudo e em estudos anteriores do nosso laboratório (Gouvea et al., 2003; Gouvea et al., 2004). Corroborando nossos achados, estudos demonstram que o tratamento com L-ARG é capaz de promover proteção de órgãos-alvo, considerando sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo endotelial (Deng et al., 1995; Ackermann et al., 1998). Tem sido demonstrado que o NO contribui para ambas as fases, inicial e crônica da

hipertensão 2R1C, uma vez que o seu efeito vasodilatador é capaz de tamponar a hipertensão e manter a perfusão para ambos os rins por contrabalancear a vasoconstrição independente da Ang II (Sigmon & Beierwaltes, 1998). Mas o achado mais relevante foi que a combinação destas terapias resultou numa redução significativa da hipertensão arterial desenvolvida pelos ratos. Tem sido postulado que os fatores principais para o desenvolvimento da hipertensão 2R1C são aumento da Ang II e disfunção endotelial, assim o bloqueio de renina associado à administração exógena de L-ARG poderia, via produção de NO, restaurar a disfunção endotelial e reduzir a pressão arterial na hipertensão experimental.

O sistema nervoso simpático contribui de forma importante para o controle da pressão arterial sob diferentes condições através da modificação do débito cardíaco, resistência vascular periférica e função renal (Grisk & Rettig, 2004). Tem sido sugerido que o aumento da atividade simpática periférica presente no modelo 2R1C pode ser devido a alterações no SNC provocada por um aumento na circulação de Ang II. Um mecanismo através do qual a Ang II circulante exerce os seus efeitos centrais é pela ligação aos seus receptores em neurônios especializados em regiões do cérebro que não possuem barreira hematoencefálica, como os órgãos circunventriculares. Os órgãos circunventriculares são localizados em torno dos terceiro e quarto ventrículos e são conhecidos por serem cruciais na mediação dos aumentos da pressão arterial. Os neurônios nestas regiões, como no órgão subfornical, podem enviar o seu sinal para outra região de controle cardiovascular, o RVLM, que adicionalmente ativa várias vias neurohumorais (de Oliveira-Sales et al., 2010). Adicionalmente, o núcleo paraventricular (PVN) é um componente importante que regula o fluxo simpático através de projeções para a coluna intermediolateral da medula espinhal e do RVLM. Dentro do PVN, a Ang II

aumenta a atividade simpática e pressão arterial em ratos 2R1C. Não só a Ang II altera a atividade simpática e, dessa forma, controla a pressão arterial, mas também o NO. O NO tem demonstrado ter um efeito simpatoinibitório no PVN, uma vez que a superexpressão de nNOS no PVN pode ser responsável pela inibição da descarga simpática (Xu 2011, Zhong 2008). O mesmo ocorre no RVLM, onde estudos sugerem que o NO, especificamente nNOS, reduz a pressão arterial através da inibição do SNS (Zanzinger et al., 1995; Kagiya et al., 1997; Kagiya et al., 1998; de Oliveira-Sales et al., 2010). Dessa forma, ao administrarmos ALSK, que reduz a formação de Ang II, adicionado a L-ARG, um precursor de NO, encontramos uma diminuição da ANSR e, conseqüentemente, da PAS.

O modelo de hipertensão experimental 2R1C é caracterizado por ser dependente do SRAA, apresentar hiperatividade simpática e marcante disfunção endotelial (Arruda et al., 2005). Devido a essas características, a hipertensão 2R1C se consagra como um modelo cirurgicamente induzido de disfunção renal. Sabe-se que os pacientes hipertensos com doença renal crônica são três vezes mais propensos a morrer dentro de 8 anos do que os hipertensos sem doença renal (Pliquett et al., 2014). Diante disto, faz-se necessário analisar as alterações induzidas pelo tratamento com ALSK e L-ARG sobre a função renal, a fim de avaliar se o tratamento proposto neste estudo preserva o rim das ações deletérias promovidas pela hipertensão renovascular, pois o sistema renal íntegro é de extrema relevância na regulação da pressão arterial a longo prazo devido à sua infinita capacidade de aumentar ou diminuir a excreção de água e eletrólitos em resposta às alterações da pressão arterial sistêmica (Grisk & Rettig, 2004).

Os primeiros parâmetros renais mensurados foram o volume urinário, TFG e fluxo renal. O fluxo sanguíneo renal e a resistência vascular intra-renal são

controlados por fatores autócrinos e parácrinos, bem como respostas miogênicas e *feedback* tubuloglomerular. Na hipertensão renovascular, ocorre um aumento da resistência vascular renal, levando a um prejuízo do fluxo renal e TFG. Possíveis mecanismos responsáveis pelo aumento da resistência vascular renal incluem: sensibilidade contrátil aumentada para agonistas vasoativos; prejuízo no relaxamento dependente do endotélio; aumento do transporte de Ca^{2+} através das membranas do músculo liso vascular; atividade alterada em canais iônicos no músculo liso vascular; hipertrofia ou hiperplasia do músculo liso. Dos vasos renais, a arteríola aferente é o principal local de regulação do fluxo renal e TFG, sendo que a Ang II promove vasoconstrição nessas arteríolas (Helle et al., 2009). Portanto, em situações com altos níveis de Ang II, haverá um prejuízo nestes parâmetros. O grupo 2R1C estudado apresentou uma redução significativa do volume urinário, do fluxo sanguíneo renal e da TFG, o que pode ser explicado pela vasoconstrição causada pela Ang II nos capilares glomerulares afetando o fluxo sanguíneo renal e TFG. O tratamento com ALSK não foi capaz de restaurar estes parâmetros. Este resultado corrobora com estudos que demonstram que inibidores SRAA podem até causar insuficiência renal em situações em que há prejuízo do fluxo renal, como na hipertensão renovascular. Por outro lado, o NO desempenha um papel importante na hemodinâmica renal na hipertensão renovascular e contribui nas fases iniciais e crônicas da hipertensão 2R1C, pois seu efeito vasodilatador pode contrabalancear a vasoconstrição da Ang II, mantendo a perfusão para os rins (Helle et al., 2009). Isto está de acordo com nossos resultados, uma vez que os animais tratados com L-ARG, de maneira isolada ou associada ao ALSK, apresentaram melhora do fluxo sanguíneo renal e da TFG. Aparentemente, as ações do NO sobre os rins clipado e não-clipado são diferenciadas, pois um estudo que utilizou ratos 2R1C e administrou

por via intravenosa N(G)-nitro-L-arginina metilester (L-NAME, um bloqueador de NO) demonstrou que não houve alteração na TFG do rim clipado, mas diminuiu significativamente no rim não-clipado. Já o fluxo de sangue para ambos os rins caiu em resposta a L-NAME, porém em maior magnitude no rim não-clipado. Devido ao fato do NO ter apresentado pouca influência sobre a função renal no rim estenótico, o estímulo para o aumento da atividade do sistema NO nesta doença parece ser a tensão de cisalhamento, que está aumentado no rim não-clipado (Dedeoglu & Springate, 2001).

Se tomarmos em conjunto as ações promovidas pelo tratamento associado de ALSK+L-ARG sobre a PAS, fluxo renal e TFG, este se destaca sobre o tratamento monoterápico com ambas as drogas, pois a associação, apesar de reduzir a pressão arterial, não compromete ainda mais o fluxo sanguíneo para o rim estenótico, pelo contrário, aumenta o fluxo renal e a TFG, sugerindo que este tratamento, ao contrário do que pode ocorrer com o uso de bloqueadores do SRAA, não induz insuficiência renal na hipertensão renovascular, melhorando este quadro.

Ainda avaliando a função renal, nossos resultados mostram que no grupo 2R1C há um déficit na excreção urinária de Na^+ , Cl^- e ureia após 28 dias da indução da hipertensão. Além disso, neste grupo, a excreção de K^+ e a ureia plasmática (um marcador de insuficiência renal) foram aumentadas. Isto demonstra o prejuízo que a hipertensão promove sobre a função renal. Tem sido proposto que as alterações do fluxo sanguíneo e da pressão dentro dos vasos renais têm marcados efeitos sobre a excreção de Na^+ e de água e que o controle do tônus vascular renal é essencial para a manutenção da homeostase do fluido corporal e pressão arterial (Pallone & Cao, 2008). Aparentemente, estes prejuízos estão relacionados à Ang II atuando em receptores AT_1 , pois após o tratamento com losartan, a hemodinâmica renal basal foi

semelhante em ambos os rins clipado e não-clipado na fase crônica de ratos com hipertensão 2R1C (Sigmon & Beierwaltes, 1998). A Ang II através de sua ligação aos receptores AT1, estimula a síntese de aldosterona aumentando a reabsorção nos segmentos proximais do néfron. Um estudo demonstrou que nas medulas renais de ambos os rins de ratos 2R1C, os níveis de RNAm e atividade da ECA aumentaram, pois a maior parte da renina presente é ativa, indicando a maior formação renal de Ang II nesse modelo de hipertensão (Prieto et al., 2011). Além disso, o aumento da ANSR leva à diminuição da excreção de sódio e água produzindo a disfunção renal (Salgado, Durand, Salgado, 2011), uma vez que a atividade simpática eferente estimula a liberação de renina, aumenta a reabsorção de sódio e reduz o fluxo sanguíneo renal, fornecendo bases para um mecanismo plausível no desenvolvimento da hipertensão (Brito & Bortolotto, 2011). O tratamento unicamente com ALSK não foi capaz de melhorar estes parâmetros, mas sua associação a L-ARG foi capaz de restaurar esses parâmetros a valores similares ao grupo SHAM. Também foi possível observar melhora da excreção eletrolítica renal no grupo tratado somente com L-ARG, o que remete a importância do NO para ajuste da vasoconstrição renal e disfunção renal, e não só o SRAA. A produção intrarrenal de NO estimulada pela L-ARG também aumenta a excreção renal de sódio por uma ação tubular direta e pela regulação do tônus vascular na resposta à pressão natriurética na medula renal (Huang et al., 2008). Da mesma forma, observamos em estudos anteriores que a L-ARG oral é capaz de aumentar a excreção de sódio (Gouvea et al., 2003).

Diante dos nossos resultados referentes à pressão arterial e função renal, percebe-se que é necessário haver um equilíbrio entre a síntese de NO e formação de ANG II. Este conceito tem sido bem demonstrado em um estudo que mostrou que

a maior parte do efeito produzido pela inibição da síntese de NO ou são minimizados ou abolidos pelo bloqueio simultâneo da ANG II e, vice-versa, que muitas das consequências que resultam do bloqueio de ANG II (vasodilatação, queda na pressão arterial, natriurese) são diminuídas pelo bloqueio de NO (Reckelhoff & Romero, 2003).

A hipertensão é a principal causa de hipertrofia do VE, uma condição que ocorre como uma adaptação a esse estímulo patológico e está relacionada com um maior risco de complicações hipertensivas, incluindo o aumento da mortalidade por doença cardiovascular (Tsilakis, Kranidis, Manolis, 2008; Li et al., 2013; Soares et al., 2011). Neste sentido, é de extrema importância desenvolver um tratamento farmacológico eficaz para impedir e/ou reverter esta hipertrofia, o que nos levou a testar o ALSK, a L-ARG e a combinação destas duas drogas. Como esperado, nossos dados demonstraram que a hipertensão renovascular promove hipertrofia do VE. Este achado está de acordo com a literatura que apresenta vários estudos que também encontraram hipertrofia ventricular esquerda em ratos 2R1C (Chen et al., 2014; Li et al., 2013; Martins-Oliveira et al., 2012; Soares et al., 2011; Sheng et al., 2007). Sabe-se que a Ang II exerce efeito inotrópico e promove proliferação e hipertrofia de fibroblastos cardíacos, levando a hipertrofia dos miócitos, parcialmente devido ao aumento da atividade da metaloproteinase de matriz 2, promovendo remodelamento cardiovascular induzido pela ativação dos receptores AT₁ (Martins-Oliveira et al., 2012). Neste sentido, estudos demonstraram que o tratamento com BRAT₁, como o ibesartan e olmesartan, assim como IECA reduziram a hipertrofia do VE, reduzindo a deposição de colágeno e a expressão protéica de metaloproteinase de matriz-2 (Li et al., 2013; Chen et al., 2014; Sheng et al., 2007). Diante disto, inicialmente hipotetizamos que o ALSK, ao minimizar a produção de Ang II, poderia

reduzir a hipertrofia cardíaca, entretanto este fato não ocorreu. Outro estudo que utilizaram o tratamento com ALSK em ratos 2R1C também não obtiveram êxito na redução da hipertrofia do VE, embora tenha reduzido a atividade da renina plasmática e, dessa forma, demonstraram que o bloqueio direto da renina reduz a sua capacidade de degradar angiotensinogênio e gerar Ang I, mas não inibe a sinalização pró-fibrose induzida pelo receptor de renina/(pro)renina (Martins-Oliveira et al., 2012). Este fato pode ser atribuído a uma elevação compensatória na concentração de renina plasmática com o tratamento com ALSK na hipertensão 2R1C (Krebs et al., 2007), ativando ainda mais o receptor de renina/(pro)renina, que, por sua vez, ativa vias dependentes de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Isto resulta na proliferação de células do músculo liso vascular e superexpressão de proteínas de matriz e proteínas profibróticas (Huang et al., 2006; Nguyen & Danser, 2008; Danser, 2010; Liu et al., 2011). No entanto, quando administramos L-ARG de maneira isolada ou combinada com ALSK, ocorreu uma redução da hipertrofia ventricular esquerda. Em nossos estudos anteriores observamos que mesmo com 7 dias de tratamento com L-ARG já há uma redução da atividade da ECA em ratos 2R1C (Gouvea et al., 2004), que, possivelmente, promove uma diminuição da formação de Ang II, reduzindo a ativação de receptores AT₁ e os estímulos profibróticos desencadeados por eles.

Embora a hipertensão renovascular tenha levado a uma significativa hipertrofia do VE, nenhuma alteração foi encontrada no peso do VD em ratos 2R1C no nosso estudo. De forma semelhante, Krandycheva et al. em 2010 também não encontraram alterações no peso do VD em ratos 2R1C. Poucos trabalhos analisam este parâmetro em contraste com numerosos estudos que avaliam a hipertrofia ventricular esquerda, devido à relevância funcional deste último.

Com relação às alterações nas massas renais, observamos que os ratos 2R1C e 2R1C ALSK apresentaram atrofia do rim clipado e uma hipertrofia do rim não-clipado, e somente os tratamentos com L-ARG e ALSK+L-ARG preservaram a massa do rim clipado e demonstraram redução do peso do rim não-clipado. Durante a hipertensão renal 2R1C, o rim clipado em função da redução do fluxo sanguíneo renal sofre redução em seu peso, enquanto o rim contralateral, não-clipado, aumenta sua massa e tamanho, provavelmente devido a uma hiperfunção compensatória (Rodrigues et al., 2007; Soares et al., 2011). Essas alterações de peso no rim não-clipado são ainda acompanhadas de injúria tubulointersticial marcante, esclerose glomerular, além de fibrose intersticial e atrofia tubular (Kobayashi et al., 1999). Sabe-se que Ang II causa vasoconstrição levando à hipertrofia glomerular, com aumento do tecido conectivo e deposição de matriz extracelular, e que, por outro lado, o NO impede a hipertrofia glomerular, uma vez que a concentração plasmática de ADMA (inibidor endógeno da síntese de NO) aumenta marcadamente em pacientes com hipertensão e é responsável por induzir fibrose glomerular e vascular (Tain et al., 2011). Da mesma forma como foi observado no peso do VE, o tratamento com ALSK não foi capaz de impedir as consequências renais desencadeadas pela hipertensão renovascular possivelmente pelo fato desta droga induzir aumento na concentração de renina com superativação do receptor de renina/(pro)renina promovendo efeitos pró-fibróticos.

No modelo experimental de hipertensão 2R1C, ocorre disfunção endotelial com geração de espécies reativas de oxigênio e menor biodisponibilidade de NO (Arruda et al., 2005). Neste sentido, evidências sugerem que o tratamento com ALSK aumenta a biodisponibilidade de NO e ainda melhora a aterosclerose em modelos animais (Imanishi et al., 2008; Nussberger et al., 2008). Adicionalmente, a

suplementação oral de L-arginina vem demonstrando ser efetiva no aumento substancial dos níveis de NO e do *status* antioxidante, tanto em ratos como em humanos (Jablecka et al., 2004; Senbel et al., 2014). Diante destas evidências, resolvemos avaliar, mesmo que de maneira indireta, como estava a formação renal de NO. Para isso nós analisamos a expressão protéica das três isoformas de NOS.

A expressão da nNOS se dá principalmente na mácula densa, região que funciona como um sensor tubular de NaCl, sendo que a captação desse sal pelo cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ localizado na membrana apical das células da mácula densa desencadeia uma cascata de transdução de sinais que envolvem a síntese de NO através da nNOS (Persson & Bachman, 2000). A nNOS participa no controle da hemodinâmica glomerular através do *feedback* tubuloglomerular e liberação de renina (Cherla & Jaimes, 2004). Dessa forma, a proteína nNOS tem sido relatada de estar inversamente correlacionada com o desenvolvimento dos danos aos rins (Rusai et al., 2008). No córtex renal, nNOS dilata as arteríolas aferentes e reduz a reabsorção de sódio, e dessa forma, parece contrabalancear a diminuição da TFG induzida pela Ang II (Tain et al., 2011). Nossos dados demonstram uma diminuição da expressão da nNOS no rim não-clipado de ratos 2R1C, o que possivelmente contribui para a hipertensão devido ao aumento da ANSR e prejuízo da função renal promovido pela falta desta isoforma da NOS. Um estudo que investigou a expressão da nNOS em artérias mesentéricas de ratos 2R1C demonstrou que houve diminuição da expressão de nNOS. Essa redução de nNOS levou ao aumento da neurotransmissão adrenérgica e contribuiu para a iniciação e o desenvolvimento da hipertensão renovascular (Koyama et al., 2010), uma vez que desencadeia aumento da atividade simpática, constrição das arteríolas aferentes e prejuízo da natriurese (Tain et al., 2011). Outro estudo demonstrou redução da nNOS no estômago de

ratos 2R1C (Kim et al., 2006). O tratamento com ALSK demonstrou uma tendência em aumentar a expressão de nNOS em ambos os rins, embora não tenha atingido significância estatística. Um estudo demonstrou que nos rins de ratos SHR de 4 semanas (que se encontram no estado pré-hipertensivo), ALSK $30\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ reduziu os níveis de ADMA (um inibidor endógeno da síntese de NO), aumentando a formação de NO, com aumento dos níveis de nNOS (Tain et al., 2011).

Por outro lado a iNOS é expressa em níveis baixos em tecidos normais, mas pode ser induzida em resposta a estímulos, tais como lesão de tecidos e em doenças inflamatórias como, por exemplo, a hipertensão arterial (Briones et al., 2000; Álvarez et al., 2008; Sun et al., 2010). Nos rins, a iNOS é expressa sob condições patológicas, como na hipertensão renovascular, no mesângio glomerular e túbulos (Cherla & Jaimes, 2004). Este fato corrobora com nossos dados que demonstraram um aumento na expressão de iNOS nos ratos 2R1C. Outros estudos também obtiveram o mesmo resultado em anéis de aorta (Cau et al., 2011; Santuzzi et al., 2015), no coração (Sun et al., 2009) e no RVLM (de Oliveira-Sales et al., 2010) de ratos 2R1C. Aparentemente o mecanismo para o aumento da expressão de iNOS se inicia com o fator nuclear kappa B que é ativado por espécies reativas de oxigênio, que então induz a expressão do gene para iNOS (Huang et al., 2008). O aumento da expressão da iNOS produz quantidades excessivas de NO, o qual reage com superóxido para formar peroxinitrito, o que facilita a instalação de um estado pró-oxidante e aumenta o tônus vasoconstritor nas artérias por diminuir a biodisponibilidade de NO (Sun et al., 2009; Cau et al., 2011). Além disso, a própria iNOS é capaz de produzir superóxido, o qual é transformado a peróxido de hidrogênio. Ambos, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, têm sido implicados na lesão tecidual e disfunção de muitos órgãos (Sun et al., 2009). No entanto, o

significado fisiopatológico da indução/ativação da iNOS permanece controverso e parece ser tecido-específico. Um estudo demonstrou que a iNOS desempenha um importante papel na proteção dos rins numa condição de isquemia, que pode ser explicado pela inflamação intersticial estimulando a iNOS a gerar NO, na tentativa de atenuar as interações pós-isquêmicas entre leucócitos e endotélio (Park et al., 2003). Além desses efeitos teciduais, também é de grande relevância os efeitos sistêmicos promovidos pela iNOS, uma vez que um estudo demonstrou que o NO (produzido pela iNOS) assim como a Ang II (via receptores AT₁) no RVLM estão envolvidos na manutenção da hipertensão arterial e simpatoexcitação nos ratos 2R1C (de Oliveira-Sales et al., 2010). Por outro lado, o tratamento com ALSK como monoterapia ou em associação com L-ARG foi capaz de reduzir a expressão de iNOS no rim não-clipado. O ALSK também reduziu os níveis de iNOS em aortas de ratos 2R1C e no miocárdio de ratos SHR que sofreram isquemia/reperfusão, possivelmente pelo seu efeito antioxidante, pois esta droga é capaz de reduzir a geração de ânion superóxido e peroxinitrito (Imanishi et al., 2008; Zhang et al., 2014; Santuzzi et al., 2015).

No rim a atividade da eNOS é importante para a manutenção da TFG, do tônus vascular regional, e do fluxo sanguíneo renal desempenhando papel importante na patofisiologia da hipertensão renovascular (Cherla & Jaimes, 2004; Wickman et al., 2001). Nossos achados demonstram uma diminuição da expressão de eNOS somente no rim clipado. Helle et al. (2009) demonstrou que a expressão de eNOS foi diminuída somente no rim clipado em vasos de resistência pré-glomerulares (arteríola aferente). Isso pode reduzir a liberação de NO e contribuir para a disfunção endotelial renal em ratos 2R1C. Adicionalmente, Rochette et al. (2013) demonstrou que forças mecânicas na parede vascular, como

a elevada pressão arterial e a tensão de cisalhamento são fatores que elevam a expressão endotelial de eNOS, o que pode explicar a diferença na expressão desta proteína entre o rim clipado e não-clipado, uma vez que no rim clipado a tensão de cisalhamento está menor, reduzindo assim o estímulo para a síntese de eNOS, o que limitaria a liberação de NO promovendo uma redução do fluxo sanguíneo renal. No entanto, a expressão de eNOS em ambos os rins na hipertensão renovascular é divergente na literatura, há trabalhos demonstrando que não existe alteração na expressão desta proteína (Reinhold et al., 2009) enquanto outros demonstram que ocorre diminuição de eNOS em ambos os rins (Wickman et al., 2001; Wu et al., 2012). A expressão da eNOS nos ratos tratados com ALSK foi similar ao grupo SHAM em ambos os rins. Poucos estudos avaliaram a expressão das isoformas da NOS com a administração de ALSK. Um trabalho realizado em nosso laboratório em aortas de ratos 2R1C também apresentou valores de eNOS semelhantes entre o grupo SHAM e 2R1C ALSK (Santuzzi et al., 2015). De maneira diferente, Zhang et al. (2014) demonstrou que o tratamento com ALSK aumentou a expressão da eNOS fosforilada no miocárdio de ratos espontaneamente hipertensos submetidos a 30 minutos de oclusão da artéria coronária descendente anterior, seguido de 6 ou 24 horas de reperfusão.

Diante dos resultados da expressão das três isoformas da NOS nos rins, pode-se ressaltar que a hipertensão renovascular promoveu aumento da expressão de iNOS, porém diminuição da expressão de eNOS e nNOS. Têm sido observado que, em estados patológicos, iNOS pode ser superexpressa, e tanto a expressão da eNOS quanto de nNOS podem ser reduzidas (Huang et al., 2008). Neste sentido, sabe-se que a isquemia, como a que ocorre no rim clipado, diminui a concentração de L-ARG no córtex e na medula renal, resultando numa diminuição de fornecimento

de substrato para a síntese de NO. No entanto, essa situação pode ser revertida pela suplementação exógena de L-ARG (Rusai et al., 2008). Um estudo demonstrou que a infusão de L-ARG nos rins pode estimular a produção de NO intrarenal pelo aumento da atividade da NO *in vivo* (Huang et al., 2008). Adicionalmente, outro estudo demonstrou que em rins que sofreram isquemia, a suplementação com L-ARG por 7 dias aumentou a expressão de RNAm para as três isoformas de NOS (Rusai et al., 2008). Em nosso estudo, a administração exógena de L-ARG por 21 dias foi capaz de aumentar a expressão de eNOS, iNOS e nNOS.

Por fim, o tratamento com a associação do ALSK+L-ARG apresentou valores de expressão de nNOS, iNOS e eNOS muito semelhantes aos encontrados com o tratamento monoterápico com ALSK, com exceção da expressão da nNOS no rim não-clipado em que a associação foi capaz de aumentar esses valores quando comparado ao grupo 2R1C. Como descrito anteriormente, a nNOS protege os rins dos danos promovidos pela hipertensão 2R1C (Rusai et al., 2008), o que justifica a renoproteção encontrada no grupo 2R1C ALSK+L-ARG, mas não no grupo 2R1C ALSK. No entanto, como observado neste estudo, o tratamento somente com L-ARG promoveu a mesma resposta protetora nos rins do que a associação, demonstrando que realmente essa proteção se deve a maior formação de NO, especialmente através da nNOS. Por outro lado, o tratamento associado com ALSK+L-ARG foi o único capaz de normalizar os níveis de PAS bem como melhorar a ANSR, demonstrando assim, que a diminuição da PAS encontrada no grupo associado se deve, principalmente, à diminuição da ANSR e não à melhora da função renal pelo aumento de NO.

Diante de todos os nossos resultados, podemos concluir que a associação das terapias é mais eficiente do que o tratamento isolado com ambas as drogas,

demonstrando que tanto o SRAA quanto o NO participam da patogênese da hipertensão renovascular, e que essa nova proposta de tratamento, além de reduzir os níveis pressóricos, também é capaz de melhorar a função renal, a hipertrofia cardíaca e a atividade nervosa renal, o que levaria a proteção de órgãos-alvo.

7 REFERÊNCIAS

Ackermann A, Fernández-Alfonso MS, Sánchez de Rojas R, Ortega T, Paul M, González C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 1998; 124: 291-298.

Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the rennin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med*, 1991; 324: 1098-1104.

Alderman MH. Plasma Renin Activity and coronary heart disease: are they related? *Current Opinions in Nephrology and hypertension*, 1995; 4:201-203.

Al-Suraih M, Grande JP. Management of renal artery stenosis: What does the experimental evidence tell us? *World J Cardiol*, 2014; 6(8): 855-860.

Alvaréz Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaceis M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 2008; 153:926-935.

Angeli F, Reboldi G, Poltronieri P, Angeli E, De Filippo V, Crocetti A, Bartolini C, D'Ambrosio C, Verdecchia P. Efficacy and Safety Profile of Aliskiren: Practical Implications for Clinicians. *Current Drug Safety*, 2014; 9: 106-117.

Anh KY, Mohaupt MG, Madsen KM, Kone BC. In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *American Journal of Physiology*, 1994; 267: 748-757.

Arruda R.M., Peotta V.A., Meyrelles S.S., Vasquez E.C. Evaluatio of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension*, 2005; 46(4): 932-6.

Atlas SA. The rennin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Phar*, 2007; 13(8 Suppl B): 9-20.

Bachmann S, Mundel P. NO in the kidney: synthesis localization and function. *American Journal of Kidney Diseases*, 1994; 24: 112-129.

Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 439–465.

Barman SM, Gebber GL, Calaresu FR. Differential control of sympathetic nerve discharge by the brainstem. *American Journal of Physiology*, 1984; 262: 513-519.

Bohm M, Linz D, Ukena C, Esler M, Mahfoud F. Renal denervation for the treatment of cardiovascular high risk hypertension or beyond?" *Circulation Research*, 2014; 115(3): 400–409.

Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagon G, Salaceis M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in the mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*, 2000; 131(2): 185-194.

Brito TM, Bortolotto LA. Denervação renal no tratamento de hipertensão arterial resistente. *Rev Bras Hipertens*, 2011; 18(4): 145-8.

Burke SL, Evans RG, Head GA. Effects of chronic sympatho-inhibition on reflex control of renal blood flow and plasma rennin activity in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol*, 2010; 159: 438–448.

Burke SL, Head GA. Cardiac and renal baroreflex control during stress in conscious renovascular hypertensive rabbits: effect of rilmenidine. *J Hypertens*, 2009; 27: 132–141.

Cabral AM, Vasquez EC, Mauad H. Hipertensão Experimental: Aspectos Fisiopatológicos e Técnicas de Produção. *Hipertensão Arterial. Sarvier*, 1997; 61-71.

Campos JrR, Colombari, E, Cravo S, Ubriano O. Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. *Revista Brasileira de Hipertensão Arterial*, 2001; 8: 41-54.

Campos RR., Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2011; 38(2): 144–152.

Cannon III RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*.1998; 44(8): 1809-1819.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 2003; 24: 261-71.

Carlstrom M. Causal link between neonatal hydronephrosis and later development of hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2010; 37(2):14–e23.

Cau SB, Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Souza LL, Tirapelli CR, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol*, 2011; 164(2): 372-81.

Chen Q, Pang L, Huang S, Lei W, Huang D. Effects of emodin and irbesartan on ventricular fibrosis in Goldblatt hypertensive rats. *Pharmazie*, 2014; 69(5): 374-8.

Chen Y, Meng L, Shao H, Yu F. Aliskiren vs. other antihypertensive drugs in the treatment of hypertension: a meta-analysis. *Hypertens Res*, 2013; 36(3): 252-261.

Cherla G, Jaimes EA. Role of L-Arginine in the Pathogenesis and Treatment of Renal Disease. *J Nutr*, 2004; 134: 2801S–2806S.

Cheung BM. Blockade of the rennin angiotensin system. *HKMJ* 2002; 8: 185-91.

Chou CL, Pang CY, Lee TJ, Fang TC. Direct renin inhibitor prevents and ameliorates insulin resistance, aortic endothelial dysfunction and vascular remodeling in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertens Res*, 2013; 36: 123-128.

Ciriello J, Calaresu, FR. Central projections of afferent renal fibers in the rat: an anterograde transport study of horseradish peroxidase. *Journal of Autonomic Nervous System*, 1983; 8: 273-285.

Cole J, Ertoy D, Lin H, Sutliff RL, Ezan E, Guyene TT, Capecchi M, Corvol P, Bernstein KE. Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. *J Clin Invest*, 2000; 106: 1391-1398.

Dahlof B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metaanalysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens* 1992; 5: 95-110.

Danser AH. (Pro)renin receptors: Are they biologically relevant? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009; 18(1): 74–78.

Danser AH. The increase in renin during renin inhibition: does it result in harmful effects by the (pro)renin receptor? *Hypertens Res*, 2010; 33:4–10.

Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109[suppl III]:III-27–III-32.

De Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR. Upregulation of AT1R and iNOS in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) is essential for the sympathetic hyperactivity and hypertension in the 2K-1C Wistar rat model. *Am J Hypertens*, 2010; 23(7): 708-15

Dedeoglu IO, Springate JE. Effect of nitric oxide inhibition on kidney function in experimental renovascular hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 2001; 23(3): 267-75

Dendorfer A, Thornagel A, Raasch W, Grisk O, Tempel K, Dominiak P. Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation. *Hypertension*, 2002; 40: 348–54.

Deng X, Welch WJ, Wilcox CS. Renal vasodilation with L-arginine. *Hypertension*, 1995; 26: 256-262.

Dibona GF, Jones SY. Reflex effects on components of synchronized renal sympathetic nerve activity. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 1998; 275: 441-446.

Dibona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiology Reviews*, 1997; 77: 75-175.

Dibona GF, KOPP, UC. Neural control of the renal function: role in human hypertension. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Seldin DW, Giebisch, G, eds. New York, NY. *Raven Press*. 1992; 1157-1204.

Dibona GF, RIOS LL. Renal nerves in compensatory renal response to contralateral renal deservation. *American Journal of Physiology*, 1980; 238: 26-30.

Dibona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2000; 279: 1517-1524.

Duncan BB, Schmidt MI, Giugliani ERJ. Medicina Ambulatorial: condutas de atenção primária baseadas em evidências. 3. ed. Porto Alegre: *Artmed*, 2006; 269-275.

Dzau VJ, Gibbons GH, Pratt RE. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. *Hypertension*, 1991; 18(4 Suppl): II100-5.

Escobar C, Echarri R, Barrios V. Emerging drug combinations to optimize renovascular protection and blood pressure goals *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 2012; 5: 69-80.

Esler M. Sympathetic nervous system: contribution to human hypertension and related cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995; 26: S24–S28.

Esler M. The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens*, 2000; 13: 99S–105S.

Etelvino GM, Peluso AAB, Santos RAS. New Components of the Renin-Angiotensin System: Alamandine and the Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D. *Curr Hypertens Rep*, 2014; 16: 433.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26: 1215-25.

Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease-therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2006; 7: 3-14.

Freudenthaler SM, Schreeb K, Körner T, Gleiter CH. Angiotensin II increases erythropoietin production in healthy human volunteers. *Eur J Clin Invest*, 1999; 29(10):816-23.

Friedrich S, Schmieder RE. Review of direct renin inhibition by aliskiren. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*, 2013; 14(3): 193–196.

Funder JW. New biology of aldosterone and experimental studies on the selective aldosterone blocker eplerenone. *Am Heart J*, 2002; 144: S8-11.

Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-Angiotensin system revisited. *J Intern Med*, 2008; 264: 224-236.

Gabbai FB, Blantz RC. Role of nitric oxide in renal hemodynamics. *Semin Nephrol*, 1999; 19(3): 242-50.

Gava AL, Peotta VA, Cabral AM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 2008; 86(7): 458-64.

Gavras H. Angiotensin II antagonism: a new avenue of hypertension management. *Blood Press*, 1997; 1 Suppl: 42-46.

Gavras H. Corcoran Lecture. Angiotensin-converting enzyme inhibition and the heart. *Hypertension*, 1994; 23: 813-8.

Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med*, 1996; 334: 1649-54.

Gouvea SA, Moysés MR, Bissoli NS, Pires JGP, Cabral AM, Abreu GR. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2003; 36(7): 943–949.

Gouvea SA, Tiradentes RV, Santuzzi CH, Mengal V, Futuro Neto H de A, Silva NF, Abreu GR. Role of renal nerves in the treatment of renovascular hypertensive rats with L-arginine. *Int J Hypertens*, 2014; 1-7.

Gouvea, SA, Bissoli NS, Moysés MR, Cicilini MA, Pires JGP, Abreu GR. Activity of Angiotensin-Converting Enzyme After Treatment with L-Arginine in Renovascular Hypertension. *Clinical and experimental hypertension*, 2004; 56:569-579.

Gouvea, SA, Moysés MR, Bissoli NS, Pires JGP, Cabral AM, Abreu GR. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002; 36: 943-949.

Graceli JB, Cicilini MA, Bissoli NS, Abreu GR, Moysés MR. Roles of estrogen and progesterone in modulating renal nerve function in the rat kidney. *Braz J Med Biol Res*, 2013; 46: 521-527.

Grassi G, Seravalle G, Brambilla G, Mancia G. The sympathetic nervous system and new nonpharmacologic approaches to treating hypertension: a focus on renal denervation. *Canadian Journal of Cardiology*, 2012; 28(3): 311–317.

Grisk O, Rettig R. Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovascular Research*, 2004; 61: 238-246.

Guyenet PG. Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Circulation Research*, 1985; 56: 359-369.

Harrison JL, Hildreth CM, Callahan SM, Goodchild AK, Phillips JK. Cardiovascular autonomic dysfunction in a novel rodent model of polycystic kidney disease. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 2010; 152(1-2): 60–66.

Hausberg M, Tokmak F. Sympathetic nerve activity in chronic renal failure—what are the therapeutic options? *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 2013; 138(48): 2467–2470.

Helle F, Hultstrom M, Skogstrand T, Palm F, Iversen B. M. Angiotensin II-induced contraction is attenuated by nitric oxide in afferent arterioles from the nonclipped kidney in 2K1C. *American Journal of Physiology—Renal Physiology*, 2009; 296(1): F78–F86.

Hermanowicz JM, Hermanowicz A, Buczek P, Leszczynska A, Tankiewicz-Kwedlo A, Mogielnicki A, Buczek W. Aliskiren inhibits experimental venous thrombosis in two-kidney one-clip hypertensive rats. *Thromb Res*, 2013; 31(1): e39-44

Hogarth AJ, Mackintosh AF, Mary DA. The effect of gender on the sympathetic nerve hyperactivity of essential hypertension. *J Hum Hypertens*, 2007; 21: 239–245.

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*, 1999; 33: 613-21.

Hu J, Yan Y, Zhou Q et al. Effects of renal denervation on the development of post-myocardial infarction heart failure and cardiac autonomic nervous system in rats. *International Journal of Cardiology*, 2014; 172(3): e414–e416.

Huang HS, Ma MC, Chen J. Chronic L-arginine administration increases oxidative and nitrosative stress in rat hyperoxaluric kidneys and excessive crystal deposition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008; 295: F388-F396.

Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int*, 2006; 69: 105–13.

Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Kitabata H, Tanimoto T, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension*, 2008; 52(3): 563-72.

Ishimitsu T, Numabe A, Masuda T, Akabane T, Okamura A, Minami J, Matsuoka H. Angiotensin-II receptor antagonist combined with calcium channel blocker or diuretic for essential hypertension. *Hypertens Res*, 2009; 32: 962–968.

Jablecka A, Chęcinski P, Krauss H, Micker M, Ast J. The influence of two different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (NO) concentration and total

antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients. *Med Sci Monit*, 2004; 10(1): CR29-32.

Johansson M, Elam M, Rundqvist B, Eisenhofer G, Herlitz H, Lambert G, Friberg P. Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension. *Circulation*, 1999; 99: 2537–2542.

Juncos LA, Garvin J, Carretero AO, Ito S. Flow modulates myogenic responses in isolated microperfused rabbit afferent arterioles via endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*, 1995; 95(6): 2741-8

Kagiyama S, Tsuchihashi T, Abe I, Fujishima M. Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats. *Brain Res*, 1997; 757:155–158.

Kagiyama S, Tsuchihashi T, Abe I, Fujishima M. Enhanced depressor response to nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1998; 31:1030–1034.

Katholi RE, Whitlow PL, Winternitz SR, Oparil S. Importance of the renal nerves in established two-kidney, one clip Goldblatt hypertension. *Hypertension*, 1982; 4: 166–174.

Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol*, 1993; 100(5): 567-75.

Kim DD, Pica AM, Durán RG, Durán WN. Acupuncture reduces experimental renovascular hypertension through mechanisms involving nitric oxide synthases. *Microcirculation*, 2006; 13(7): 577-85

Klima L. et al. Structure and function of large arteries in hypertension in relation to oxidative stress markers. *Kardiol Pol*, 2013; 71(9): 917-923.

Kobayashi S, Ishida A, Moriua H, et al. Angiotensin II receptor blockade limits kidney injury in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats with special referente to phenotypic changes. *J. Lab. Clin. Méd*, 1999; 133: 134-143.

Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol*, 1997; 272(5 Pt 2): F561-78.

Kone BC. Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis*, 1997; 30(3): 311-33.

Kopp UC, Cicha MZ, Smith LA. Impaired responsiveness of renal mechanosensory nerves in heart failure: role of endogenous angiotensin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003; 284: R116 – 24.

Kopp UC, Jones SY, DiBona GF. Afferent renal denervation impairs baroreflex control of efferent renal sympathetic nerve activity. *The American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2008; 295(6): R1882–R1890.

Koyama T, Hatanaka Y, Jin X, Yokomizo A, Fujiwara H, Goda M, Hobara N, Zamami Y, Kitamura Y, Kawasaki H. Altered function of nitrergic nerves inhibiting sympathetic neurotransmission in mesenteric vascular beds of renovascular hypertensive rats. *Hypertens Res*, 2010; 33(5): 485-91

Krandycheva VV, Kharin SN, Azarov YE, Shmakov DN. Changes of repolarization properties of the right ventricle in hypertensive left ventricular hypertrophy. *Kardiologiia*, 2010; 50(4): 31-4.

Krebs C, Hamming I, Sadaghiani S, et al. Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Kidney Int*, 2007; 72:725–30.

Laragh JH. Renin-angiotensin-aldosterone system for blood pressure and electrolyte homeostasis and its involvement in hypertension, in congestive heart failure and in associated cardiovascular damage (myocardial infarction and stroke). *J Hum Hypertens*, 1995; 9: 385-390.

Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F, Jankowski J, Jankowski V, Sousa F, Alzamora A, Soares E, Barbosa C, Kjeldsen F, Oliveira A, Braga J, Savergnini S, Maia G, Peluso AB, Passos-Silva D, Ferreira A, Alves F, Almir Martins, Mohan Raizada, Renata Paula, Daisy Motta-Santos, Friederike Kemplin, Pimenta A, Alenina N, Sinisterra R, Bader M, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Discovery and Characterization of Alamandine: A Novel Component of the Renin–Angiotensin System. *Circ Res*, 2013; 112: 1104-1111.

Ledingham JH. Mechanism of renal hypertension. *Proc Royal Soc Med*, 1971; 64: 409-418.

Lerman OL, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: An overview. *J Lab Clin Med*, 2005; 146: 160-173.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med*, 1993; 329: 1456-62.

Li ZC, Yu HY, Wang XX, Zhang M, Wang JP. Olmesartan medoxomil reverses left ventricle hypertrophy and reduces inflammatory cytokine IL-6 in the renovascular hypertensive rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013; 17(24): 3318-3322.

Liu G, Hitomi H, Hosomi N, et al. Prorenin induces vascular smooth muscle cell proliferation and hypertrophy via epidermal growth factor receptor-mediated extracellular signal-regulated kinase and Akt activation pathway. *JHypertens*, 2011; 29: 696–705.

Liu JL, Murakami H, Sanderford M, Bishop VS, Zucker IH. ANG II and baroreflex function in rabbits with CHF and lesions of the area postrema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1999; 277: H342–H350.

Lizakowski S, Tylicki L, Rutkowski B. Direct renin inhibition – a promising strategy for renal protection? *Med Sci Monit*, 2013; 19: 451-457.

Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*, 2001; 88(8): 756-62.

Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*. 1992; 70(5): 705-7.

Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 1951; 193(1): 265-275.

Ma X, Abboud FM, Chapleau MW. A novel effect of angiotensin on renal sympathetic nerve activity in mice. *J Hypertens*, 2001; 19: 609 – 18.

Macmahon S, Peto R, Cutler J. Blood pressure, stroke and coronary heart disease: effects of prolonged differences in blood pressure-evidence from nine prospective observational studies corrected for dilution bias. *Lancet*, 1995; 335: 765-774.

Maggi, CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: cardiovascular system . *Experientia*, 1986; 42: 292-297.

Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens*, 2001; 14(6 Pt 2): 74S-82S.

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G et al. 2007 guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*, 2007; 25: 1105–1187.

Mancini GB, Henry GC, Macaya C et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation*, 1996; 94: 258-65.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*, 1993; 268(17): 12231-4.

Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*, 1991; 17: 707-19.

Martinez-Revelles S. et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013; 18(1): 51-65.

Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes D, Reis RI, Costa-Neto CM, Casarini DE, Ribeiro AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *Inter J Cardiol*, 2012; 167(4): 1199-205.

Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DMM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes D, Reis RI, Costa-Neto CM, Casarini DE, Ribeiro AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *Int J Cardiol*, 2013; 167(4): 1199-1205.

McBryde FD, Guild SJ, Barrett CJ, Osborn JW, Malpas SC. Angiotensin II-based hypertension and the sympathetic nervous system: the role of dose and increased dietary salt in rabbits. *Exp Physiol*, 2007; 92: 831–840.

Meade TW, Cooper JA, Peart WS. Plasma renin activity and ischemic heart disease. *N Engl J Med*, 1993; 329: 616-619.

Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TM, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis*, 2011; 10: 211.

Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J lin Invest*, 1997; 100(9): 2146-52.

Millatt LJ, Abdel-Rahman EM, Siragy HM. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept*, 1999; 81(1-3): 1-10.

Miyajima E, Yamada Y, Yoshida Y, et al. Muscle sympathetic nerve activity in renovascular hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension*, 1991; 17: 1057 – 62.

Moncada M, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*.1991; 43: 109-142.

Mrug M, Stopka T, Julian BA, Prchal JF, Prchal JT. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest*, 1997; 100: 2310-2314.

Musini VM, Fortin PM, Bassett K, Wright JM. Blood pressure lowering efficacy of renin inhibitors for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008.

Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 1994; 269(19): 13725-8.

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*, 2002; 39: 316-322.

Navar LG, Zou L, Thun AV, Wang CT, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol. Sci*, 1998; 13: 170-176.

Nguyen G, Danser AH. Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exp Physiol*, 2008; 93: 557–63.

Nussberger J, Aubert JF, Bouzourene K, Pellegrin M, Hayoz D, Mazzolai L. Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine. *Hypertension*. 2008; 51: 1306–1311

Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002; 282(5): F777-84

Pallone TL, Cao C. Renal cortical and medullary microcirculations. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, edited by Alpern RJ, Hebert SC. Burlington VT: Elsevier, 2008, p. 627–670.

Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible Nitric-oxide Synthase Is an Important Contributor to Prolonged Protective Effects of Ischemic Preconditioning in the Mouse Kidney. *J Biol Chem*, 2003; 278: 27256-27266.

Passos-Silva, DG, Verano-Braga T, Santos RAS. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. *Clinical Science*, 2013; 124: 443–456.

Patzak A, Lai EY, Mrowka R, Steege A, Persson PB, Persson AE. AT1 receptors mediate angiotensin II-induced release of nitric oxide in afferent arterioles. *Kidney Int*, 2004; 66(5): 1949-58.

Persson AE, Bachmann S. Constitutive nitric oxide synthesis in the kidney--functions at the juxtaglomerular apparatus. *Acta Physiol Scand*, 2000; 169(4): 317-24.

Persson F, Rossing P, Parving HH. Direct renin inhibition in chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol*, 2012; 76(4): 580–586.

Pfeffer MA, Braunwald E, Moyet LA et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*, 1992; 327: 669-77.

Pimenta E, Oparil S. Prehypertension: epidemiology, consequences and treatment. *Nature Review Nephrology*, 2010; 6(1): 21-30.

Pliquett RU, Benkhoff S, Jung O, Brandes RP. Sympathoactivation and rho-kinase-dependent baroreflex function in experimental renovascular hypertension with reduced kidney mass. *BMC Physiol*, 2014; 14: 4.

Pradhan N, Rossi NF. Interactions Between the Sympathetic Nervous System and Angiotensin System in Renovascular Hypertension. *Current Hypertension Reviews*, 2013; 9: 121-129.

Pradhan N, Rossi NF. Interactions Between the Sympathetic Nervous System and Angiotensin System in Renovascular Hypertension. *Current Hypertension Reviews*, 2013; 9: 121-129

Pradhan N, Rossi NF. Interactions between the sympathetic nervous system and angiotensin system in renovascular hypertension. *Curr Hypertens Rev*, 2013; 9(2): 121-9.

Praxedes JN. Hipertensão renovascular: epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Hiperten*, 2002; 9: 148-153.

Prieto MC, González-Villalobos RA, Botros FT, Martin VL, Pagán J, Satou R, Lara LS, Feng Y, Fernandes FB, Kobori H, Casarini DE, Navar LG. Reciprocal changes in renal ACE/ANG II and ACE2/ANG 1–7 are associated with enhanced collecting duct renin in Goldblatt hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011; 300: F749–F755.

Pullalarevu R, Akbar G, Teehan G. Secondary Hypertension, Issues in Diagnosis and Treatment. *Primary care: Clinics in Office Practice*, 2014; 41(4): 749-764.

Reckelhoff JF, Romero JC. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003; 284: R893–R912.

Reinhold SW, Uihlein DC, Boger CA, Kloiber S, Frolich K, Bergler T, Banas B, Schweda F, Kramer BK. Renin, endothelial no synthase and endothelin gene expression in the 2Kidney-1clip goldblatt model of long-term renovascular hypertension. *Eur J Med Res*, 2009; 14(12): 520–525.

Reudelhuber TL. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005; 14: 155-59.

Robles NR, Cerezo I, Hernandez-Gallego R. Renin–Angiotensin System Blocking Drugs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2014; 19(1): 14-33.

Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard JC, Lorgis L, Cottin Y, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*, 2013; 140(3): 239-257.

Rodrigues AFDAC, de Lima ILB, Bergamaschi CT et al. Increased renal sympathetic nerve activity leads to hypertension and renal dysfunction in offspring from diabetic mothers. *The American Journal of Physiology—Renal Physiology*, 2013; 304(2): F189–F197.

Rodrigues MC, Campagnole-Santos MJ, Machado RP, Silva ME, Rocha JLM, Ferreira PM e cols. Evidence for a role of AT2 receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-intensity physical activity in Renovascular Hypertensive Rats. *Peptides*, 2007; 28: 1375-1382.

Roscioni SS, Heerspink HJ, de Zeeuw D. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 2014; 10(2): 77-87.

Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, John TH., Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, Reis DJ. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla:

effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate and plasma catecholamines and vasopressin. *Neuroscience*, 1984; 4: 474-494.

Rossi NF, Maliszewska-Scislo M, Chen H, Black SM, Sharma S, Ravikov R, Augustynia RA. Neuronal nitric oxide synthase within paraventricular nucleus: blood pressure and baroreflex in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Exp Physiol*, 2010; 95(8): 845–857.

Rusai K, Fekete A, Szebeni B, Vannay A, Bokodi G, Müller V, Viklicky O, Bloudickova S, Rajnoch J, Heemann U, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Szabó AJ. Effect of inhibition of neuronal nitric oxide synthase and L-arginine supplementation on renal ischaemia-reperfusion injury and the renal nitric oxide system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008; 35: 1183–1189.

Salgado HC, Durand MT, Salgado COM. Bases fisiopatológicas para novos tratamentos em hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*, 2011; 18(4): 137-44.

Salomonsson M, Brannstrom K, Arendshorst .WJ. α 1- Adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. *The American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2000; 278(1): F138–F147.

Santos RAS, Ferreira AJ, Pinheiro SVB, Sampaio WO, Touyz R, Santos MJC. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 2005; 14(8).

Santos RAS, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, Buhr I *et al*. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 8258–8263.

Santuzzi CH, Tiradentes RV, Mengal V, Claudio ER, Mauad H, Gouvea AS, Abreu GR. Combined aliskiren and L-arginine treatment has antihypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension. *Braz J Med Biol Res*, 2015; 48(1): 65-76.

Schiffrin EL. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension*, 1999; 34(4 Pt 2): 876-81

Schnackenberg C, Patel AR, Kirchner KA, Granger JP. Nitric oxide, the kidney and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1997; 24(8): 600-6.

Senbel AM, Omar AG, Abdel-Moneim LM, Mohamed HF, Daabees TT. Evaluation of L-arginine on kidney function and vascular reactivity following ischemic injury in rats: protective effects and potential interactions. *Pharmacol Rep*, 2014; 66(6): 976-83.

Sheng H, Zhu J, Wu X, Yang D, Zhang J. Angiotensin-converting enzyme inhibitor suppresses activation of calcineurin in renovascular hypertensive rats. *Hypertens Res*, 2007; 30(12): 1247-54.

Sigmon DH, Beierwaltes WH. Influence of nitric oxide in the chronic phase of two-kidney, one clip renovascular hypertension. *Hypertension*, 1998; 31(2): 649–656.

Soares ER, Lima WG, Machado RP, Carneiro CM, Silva ME, Rodrigues MC, De Castro UG, Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*, 2011; 44(6): 573-582.

Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq. Bras. Cardiol.*, Rio de Janeiro, 2010; 95(1 supl.1): 1-51.

Spence JD. Treatment options for renovascular hypertension. *Expert Opin Pharmacother*, 2002; 3: 411–416.

Stanton A. Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2003; 3: 389-94.

Stergiou GS, Skeva II. Renin-angiotensin system blockade at the level of the angiotensin converting enzyme or the angiotensin type-1 receptor: similarities and differences. *Curr Top Med Chem*, 2004; 4(4): 473-81.

Sun J, Lawrence J, Druhan J, Zweier L. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010; 494: 130-137.

Sun Y, Carretero OA, Xu J, Rhaleb NE, Yang JJ, Pagano PJ, Yang XP. Deletion of Inducible Nitric Oxide Synthase Provides Cardioprotection in Mice With 2-Kidney, 1-Clip Hypertension. *Hypertension*, 2009; 53: 49-56.

Suzuki Y, Ortega MR, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Nflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003; 35: 881- 900.

Tain YL, Hsu CN, Lin CY, Huang LT, Lau YT. Aliskiren prevents hypertension and reduces asymmetric dimethylarginine in young spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*, 2011; 670: 561–565.

The CONSENSUSTrial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med*, 1987; 316:1429-35.

Timmermans PB, Smith RD. The diversified pharmacology of angiotensin II-receptor blockade. *Blood Press Suppl*, 1996; 2: 53-61.

Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS. Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int*, 1997; 52(6): 1593-601.

Tonnesen MG, Klempner MS, Austen KF, Wintroub BU. Identification of a human neutrophil angiotension II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest*, 1982; 69(1): 25-30.

Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ella SMN, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*, 2003; 39(6): 249-267.

Tsilakis D, Kranidis A, Manolis AS. Left ventricular long-axis dysfunction in hypertensive patients. *J Hypertens*, 2008; 26(7):1497.

Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, et al. Aliskiren versus ramipril in hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2010; 4: 193-200.

Villamil A, Chrysant SG, Calhoun D, et al. Renin inhibition with aliskiren provides additive antihypertensive efficacy when used in combination with hydrochlorothiazide. *J Hypertens*, 2007; 25: 217-226.

Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*, 1999; 12(12 Pt 3): 205S-213S.

Wickman A, Andersson IJ, Jia J, Hedin L, Bergstrom G. Endothelial nitric oxide synthase protein is reduced in the renal medulla of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *J Hypertens*, 2001; 19(9): 1665-73.

Williams B. The year in hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008; 51(18): 1803–17.,

Wu X, Kong X, Zhou Y, Huang K, Yang J, Li X. Sesamin exerts renoprotective effects by enhancing NO bioactivity in renovascular hypertensive rats fed with high-fat-sucrose diet. *European Journal of Pharmacology*, 2012; 683: 231–237.

Xu B, Chen WW, Fan ZD, Han Y, Xiong XQ, Gao XY, Zhu GQ. Responses of neurons in paraventricular nucleus to activation of cardiac afferents and acute myocardial ischemia in rats. *Exp Physiol*, 2011; 96: 295–304.

Yoshitomi Y, Tarutani Y, Tsujibayashi T, Yamaguchi A, Ishii T, Kaneki M, Kawanishi K, Minai K, Saitou Y, Sakurai S, Suwa S. Effectiveness of the direct renin inhibitor, aliskiren, in patients with resistant hypertension. *Int Heart J*, 2013; 54(2): 88-92.

Zanzinger J, Czachurski J, Seller H. Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. *Am J Physiol*, 1995; 268: R958–R962

Zhang W, Han Y, Meng G, Bai W, Xie L, Lu H, Shao Y, Wei L, Pan S, Zhou S, Chen Q, Ferro A, Ji Y. Direct Renin Inhibition With Aliskiren Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Nitric Oxide Synthase Signaling in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Am Heart Assoc*, 2014; 3(1): e606.

Zhong MK, Duan YC, Chen AD, Xu B, Gao XY, De W, Zhu GQ. Paraventricular nucleus is involved in the central pathway of cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *Exp Physiol*, 2008; 93: 746–753.

Zhu JR, Sun NL, Yang K, et al. Efficacy and safety of aliskiren, a direct renin inhibitor, compared with ramipril in asian patients with mild to moderate hypertension. *Hypertens Res*, 2012; 35: 28-33.

APÊNDICE

Artigo enviado à revista Hypertension Research (aceito em 25/01/2015).

Title: Combined Aliskiren and L-arginine treatment reverses renovascular hypertension in an animal model.

Authors: Renata V. Tiradentes¹, Cintia H Santuzzi¹, Erick R.G. Claudio¹, Vinicius Mengal¹, Nyam F. Silva², Henrique de A. Futuro Neto^{2,3,4}, Nazaré S. Bissoli¹, Glaucia R. Abreu¹, Sônia A. Gouvêa^{1,5}

¹Department of Physiological Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória-ES, Brazil

²Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória-ES, Brazil

³Multivix Medical School, Vitoria, ES, Brazil

⁴ Emescam Medical School, Vitoria, ES, Brazil

⁵Nucleus of Biotechnology, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil

Running title: Effects of aliskiren and L-arginine on 2K1C rats

Correspondence:

Sônia Alves Gouvêa, PhD.

Nucleus of Biotechnology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo (UFES).

Avenida Marechal Campos, 1456 – Maruípe, Vitoria, ES, Brazil-CEP 29040-577

Tel.: +55 27 3335-7473/ 997033975 -Fax: + 55 27 3335-7330

Email: gouveasa@yahoo.com.br or sagouvea@ppgcf.ufes.br

Abstract: Renovascular hypertension is characterized by increased renal sympathetic activity, angiotensin II, and by endothelial dysfunction. The purpose of this study was to determine the role of renal sympathetic nerve activity (RSNA) in mediating the anti-hypertensive effects of aliskiren (ALSK) and L-arginine (L-ARG) in a rat renovascular hypertension model. Hypertension was induced by clipping the right renal artery, and the following 5 groups were divided: Sham operated; 2-kidney, 1-clip (2K1C); 2K1C plus ALSK; 2K1C plus L-ARG; and 2K1C plus ALSK+ L-ARG.

The systolic blood pressure (SBP) of 2K1C rats increased from 114.4 ± 5.2 to 204 ± 12.7 mmHg, ($P < 0.05$) and was only reduced by ALSK+L-ARG treatment (138.4 ± 4.37 mmHg). The 2K1C hypertension increased the baseline RSNA (SHAM: 62.4 ± 6.39 vs 2K1C: $97.4 \pm 8.43\%$). L-ARG or ALSK+L-ARG treatment significantly decreased baseline RSNA (2K1C L-ARG: 70.7 ± 2.39 ; 2K1C ALSK+L-ARG: $69.3 \pm 4.23\%$), but ALSK treatment alone did not (2K1C ALSK: $84.2 \pm 2.5\%$). Urinary water, Na^+ , Cl^- and urea excretion were similar in the 2K1C L-ARG, 2K1C ALSK+L-ARG and SHAM groups. The combination of ALSK+L-ARG restored urine flow and increased the glomerular filtration rate. The nNOS expression in the non clipped kidney was significantly increased in 2K1C ALSK+L-ARG rats. In conclusion, combined ALSK+L-ARG treatment normalizes SBP and prevents renal dysfunction in 2K1C hypertensive rats.

Key words: 2K1C hypertension, Aliskiren, L-arginine, renal function, renal sympathetic nerve activity.

Introduction

Hypertension is related not only to the development but also to the progression of renal disease. Several studies have analyzed the factors influencing the progression to chronic renal disease. Overactivity of the sympathetic nervous system (SNS) has been implicated in the development and maintenance of essential and renovascular hypertension in humans.¹⁻⁴ Studies in hypertensive animal models show an increase in basal renal sympathetic nerve activity (RSNA).^{5,6} The excessive sympathetic nerve activity plays a pathogenic role in triggering and sustaining both hypertension and a progression to organ damage. In particular, alterations in RSNA that influence hormones affecting renal function and urinary salt and water excretion influence blood pressure in the long term,⁷ and inhibition of sympathetic activation has an antihypertensive effect.^{8,9} Additionally, the positive impact of a lower RSNA was associated with a trend towards greater blood flow and improved vascular conductance in the stenotic kidney.⁴ However, the mechanism of sympathetic activation in hypertension is not well understood.¹⁰ Renal nerves are known to produce renal vasoconstriction, albeit at higher levels of RSNA than are required to release renin.⁴

Importantly, in the two-kidney, one-clip (2K1C) model of renovascular hypertension, excitatory synaptic inputs to the rostral ventrolateral medulla (RVLM) and the cardiac sympathetic afferent reflex are enhanced;¹⁰ factors that may partly contribute to sympathetic activation and hypertension.¹¹ In 2K1C renovascular hypertension, the renal artery stenosis caused by the clip reduces the perfusion of the clipped kidney, raising plasma renin activity (PRA) and circulating angiotensin II (Ang II), and increasing systolic blood pressure (SBP). In addition, various functional abnormalities, including impaired endothelium-dependent vasodilation, have been reported in the contralateral, non-clipped kidney.

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays a pivotal role in the pathogenesis of 2K1C hypertension. The renin angiotensin blockers such as angiotensin converting enzyme

inhibitors (ACEIs), AT1 receptor antagonists (ARBs), and, more recently, renin inhibitors⁴ are one class of drugs used for treatment. Many clinical trials have demonstrated that blockade of RAAS prevents the development and progression of chronic kidney disease and its complications, such as hypertension and cardiovascular disease. Moreover, renal sympathetic denervation have recently been developed as treatments for resistant hypertension¹² as well as inhibition of the SNS is an appropriate and effective treatment for renovascular hypertension.⁴

Aliskiren is an orally active, non-peptide, direct renin inhibitor, which acts by binding to the active site of renin. Aliskiren directly inhibits PRA, the initial and rate-limiting step in the RAAS, unlike the ACEIs and ARBs, which cause a reactive rise in PRA.¹³

Several clinical studies have demonstrated that aliskiren is effective in decreasing blood pressure in patients with mild-to-moderate hypertension¹⁴ and prevents and ameliorates insulin resistance, aortic endothelial dysfunction and oxidative vascular remodeling in fructose-fed hypertensive rats¹⁵.

A previous study has reported that oral L-ARG reduced SBP and acted on the kidney, possibly inducing changes in renal hemodynamics or tubular transport due to an increase in nitric oxide formation.¹⁶

Since in renovascular hypertension there is an excessive activation of the RAAS and a labeled endothelial dysfunction, the present study aims to examine the effects of ALSK and L-ARG, alone or in combination, on blood pressure control, renal sympathetic activity and renal function, and evaluates the reversal and / or prevention of cardiac and renal alterations induced by renovascular hypertension. We also aimed to investigate factors that could be related to a better antihypertensive response.

Methods

Animals and treatment

Male Wistar rats (150-170 g) were used for these studies. The care and use of laboratory animals were in accordance with NIH guidelines, and all experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology and were approved by the Institutional Ethics Committee of the Federal University of Espírito Santo (CEUA-UFES 004/2010). All rats had free access to water and were fed rat chow *ad libitum*. Rats were divided into five groups: SHAM (normotensive control, vehicle-saline, by gavage, 0.3 mL); two-kidney one-clip (2K1C; hypertension control, vehicle-saline, by gavage, 0.3 mL); two-kidney one-clip treated with aliskiren (2K1C ALSK; dose: 50 mg/Kg by gavage, 0.3 mL/day); two-kidney one-clip treated with L-arginine (2K1C L-ARG; dose: 10 mg/Kg by gavage, 0.3 mL/day) and two-kidney one-clip treated with aliskiren and L-arginine. (2K1C ALSK+L-ARG; aliskiren dose: 50 mg/Kg and L-arginine dose: 10 mg/Kg by gavage, 0.3 mL/day).

Surgical procedures and experimental design

Renovascular hypertension was induced by the Goldblatt two-kidney one-clip (2K1C) method as described in our previous reports.^{16,17} Under intraperitoneal anesthesia with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), a 0.20-mm internal diameter silver clip was placed through a flank incision around the right renal artery to induce renovascular hypertension (2K1C). SHAM-operated rats underwent a similar procedure with manipulation of the right renal artery but without permanent application of the clip. The criterion for hypertension in the present study was an SBP >160 mm Hg. Only rats with SBP >160 mmHg 7 days after surgery were used in the experiments.

The treatments were started 7 days after surgery and lasted for three weeks. The animals were kept in metabolic cages for the last 24 hours of treatment to collect urine to monitor

electrolyte balance, urinary flow and glomerular filtration rate (GFR). Urine Na^+ , K^+ , Cl^- and urea concentrations were measured using a flame photometry. The GFR was determined by creatinine clearance (calculated as $(U_{\text{cr}} \times V)/P_{\text{cr}}$, where U_{cr} is urinary concentration of creatinine (mg/mL), V is urinary flow (mL/min) and P_{cr} is plasma concentration of creatinine (mg/mL).¹⁸

At the end of each experiment, the animals were decapitated, and a blood sample was taken to measure plasma creatinine. The kidneys and left ventricle were removed and decapsulated, and the left ventricle and kidney weight/body weight ratios were determined.

Measurement of systolic blood pressure (SBP)

The SBP of the tail artery was measured before production of hypertension and 7 and 28 days after surgery in conscious rats by a non-invasive computerized tail-cuff system (IITC Life Science, Inc.). The rats were trained by measuring their SBP daily for at least 5 days before 2K1C or SHAM operation. To validate the values obtained by plethysmography, at the end of treatment the rats were catheterized for direct measurement of SBP.

Renal sympathetic nerve activity (RSNA)

Anesthesia was induced with 3% halothane in a chamber and maintained with urethane (1.2 g/kg, *i.v.*). Supplementary doses of urethane were administered as required. The femoral artery was cannulated to measure blood pressure with a pressure transducer (Viggo-Spectramed, P23XL) and the heart rate was derived electronically from the blood pressure signal using a rate meter (Biotach, Gould 13-64616-66). The left femoral vein was cannulated for drug administration. Rectal temperature was maintained between 37-37.5°C with a thermostatically controlled heating blanket (Harvard).

The left kidney was exposed via a retroperitoneal approach and a renal nerve bundle was dissected carefully and freed from the surrounding tissue under microscope magnification (32x). The nerve was placed on a silver bipolar electrode and covered with mineral oil. The

nerve activity was displayed on an oscilloscope (Tektronix 2205) and monitored by audio amplification (Neurolog NL120). The signal was amplified (Neurolog NL104, Digitimer) and filtered (Neurolog NL126, Digitimer). All cardiovascular and nerve activity data were digitalized (Acknowledge for Windows, Biopac MP 100) and stored on a PC hard disk for later processing.

To evaluate the sympathetic responsiveness to vasoactive drugs, phenylephrine (PE, 8 µg/kg, i.v.) was injected in each animal to obtain a typical reflex tachycardia and sympatho-inhibition. Similarly, sodium nitroprusside (SNP, 25 µg/kg, i.v.) gave a reflex bradycardia and sympatho-excitation. After giving PE or SNP, the renal nerve activity was recorded as the difference (Δ) from each basal value. The baseline RSNA was calculated as a percentage of maximal RSNA (the RSNA before SNP divided by the maximal RSNA after SNP) $\times 100\%$.¹⁹

Western blot analyses

The clipped and non clipped kidneys were homogenized in lysis buffer containing (in mmol/l) 150 NaCl, 50 Tris-HCl, 5 EDTA, 2Na, 1 MgCl₂ plus protease inhibitor (Sigma Fast; Sigma, USA). The protein concentration was determined by the Lowry method,²⁰ using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Equal amounts of protein (50 µg) were separated by 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes that were incubated with mouse monoclonal antibodies to endothelial nitric oxide synthase (eNOS; 1:1500; BD, New Jersey, EUA), inducible nitric oxide synthase (iNOS; 1:1500; BD, New Jersey, EUA) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS; 1:250; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). After washing, the membranes were incubated with an alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgG (1:3000, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) or anti-rabbit (1:7000; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). The bands were visualized using an NBT/BCIP system (Invitrogen Corporation, CA, USA) and quantified using the *ImageJ* software (National Institute of Health, NIH). The same membranes were used to determine β -

actin expression using a mouse monoclonal antibody to β -actin (1:5000; Sigma Chemical, CO, St Louis, EUA), the results were calculated as the ratio of the density of specific bands to the corresponding β -actin.

Drugs and reagents

The following substances were used: halothane (Cristalia, Itapira, SP, Brazil); Rasilez[®] (Aliskiren; Novartis, Italy); phenylephrine hydrochloride, sodium nitroprusside, urethane and L-Arginine monohydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Salts and reagents used were of analytical grade from Sigma-Aldrich and Merck (Darmstadt, Germany). The drugs were freshly prepared and injected using saline 0.9% as vehicle.

Statistical analysis

The changes in renal function, renal nerve activity and protein expression were analyzed by one-way ANOVA for repeated measures followed by Tukey's test for *post hoc* comparison of the means. For protein expression, the data were expressed as the ratio between the densities on the immunoblot corresponding to the protein of interest and β -actin. For all analyses, differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Effects of aliskiren and L-arginine treatments on development of 2K1C hypertension

SBP values were similar in all groups of rats at the beginning of the study (Table 1) but were increased 1 week after clip placement in all operated compared with SHAM-operated rats. After 21 days of treatment, the SBP of ALSK+L-ARG group decreased by 29.8% as compared to untreated 2K1C rats. The ALSK plus L-ARG group presented similar SBP values to the SHAM group. ALSK treatment for 21 days induced a decrease of 7.07% (15.4

mmHg) in SBP as compared to 2K1C rats. A reduction of 11.09% (21.9 mmHg) in SBP was observed in L-ARG group as compared to 2K1C rats. Direct systolic pressure in conscious rats was measured and showed statistically similar values to those obtained by plethysmography at end of treatment (Table 1).

The effects of aliskiren and L-arginine treatments on left ventricle and kidney weight

Kidney/body weight ratios of the rats are shown in Table 1. ALSK treatment did not reverse the atrophy of the clipped kidney compared to the 2K1C group, and additionally, the non-clipped kidneys of 2K1C and 2K1C ALSK animals were heavier than those of the other groups. Only the 2K1C ALSK+L-ARG rats showed similar values to the SHAM group for the weights of the clipped and non-clipped kidney. Moreover, the renovascular hypertension promoted hypertrophy of the left ventricle in all clipped groups other than those treated with L-ARG or ALSK+L-ARG, whose levels did not differ from the SHAM group (Table 1).

Effects of aliskiren and L-arginine treatments on renal nerve activity and renal function

The 2K1C-induced hypertension increased the baseline RSNA (Sham: 62.4 ± 6.39 vs 2K1C: $97.4 \pm 8.43\%$). ALSK treatment did not decrease the baseline RSNA (2K1C ALSK: $84.2 \pm 2.5\%$), however treatment with L-ARG or ALSK plus L-ARG did so significantly (2K1C L-ARG: 70.7 ± 2.39 ; 2K1C ALSK+L-ARG: $69.3 \pm 4.23\%$) (Figure 1). Furthermore, the sympathetic responses to injection of PE and SNP were decreased in the 2K1C, 2K1C ALSK and 2K1C L-ARG groups compared to the SHAM rats, and only the 2K1C ALSK+L-ARG group was restored to values similar to the SHAM group (% Δ PE in SHAM: -57.1 ± 5.40 ; 2K1C: -24.7 ± 3.60 ; 2K1C ALSK: -30.3 ± 2.48 ; 2K1C L-ARG: -33.9 ± 3.92 ; 2K1C ALSK+L-ARG: -55.4 ± 6.36 and % Δ SNP in SHAM: 78.1 ± 13.21 ; 2K1C: 12.6 ± 3.37 ; 2K1C ALSK: 21.4 ± 3.67 ; 2K1C L-ARG: 38.4 ± 3.33 ; 2K1C ALSK+L-ARG: 49.2 ± 8.79) (Figure 2).

To evaluate renal function in the renovascular hypertensive rats, the plasma urea and the urinary excretion of water, Na^+ , K^+ , Cl^- and urea were measured (Table 2). The excretion of water, Na^+ , Cl^- and urea was decreased in both 2K1C and 2K1C ALSK groups compared to SHAM rats while 2K1C L-ARG and 2K1C ALSK+L-ARG groups showed similar values to the SHAM group. On the other hand, the K^+ excretion was increased only in 2K1C rats and the plasma urea was increased in 2K1C and 2K1C ALSK rats compared to SHAM rats (Table 2).

Urinary flow was significantly reduced in both 2K1C and 2K1C ALSK groups compared to SHAM rats and the GFR was increased in 2K1C L-ARG and 2K1C ALSK+L-ARG animals compared to 2K1C rats (Table 2).

Expression of nNOS, iNOS and eNOS in clipped and non-clipped kidney

The nNOS expression in the clipped kidney was significantly increased in 2K1C L-ARG rats compared with SHAM and 2K1C rats. In the non-clipped kidney, nNOS expression was significantly decreased in 2K1C rats compared to SHAM group and increased in 2K1C L-ARG and 2K1C ALSK+L-ARG compared to 2K1C rats (Figure 3).

The iNOS expression in the clipped kidney was increased in 2K1C animals compared to SHAM rats. Similarly, in the non-clipped kidney, iNOS expression was increased in the 2K1C and 2K1C L-ARG rats compared to all other groups (Figure 4).

The eNOS expression in the clipped kidney was decreased in 2K1C rats compared to SHAM group and was increased in 2K1C L-ARG rats compared to 2K1C, 2K1C ALSK and 2K1C ALSK+L-ARG groups. However, there were no significant differences in eNOS expression in the non-clipped kidneys (Figure 5).

Discussion

Our results demonstrates that combined Aliskiren and L-arginine treatment reverses renovascular hypertension in an animal model. This study provides three important new findings relevant to the potential use of ALSK plus L-ARG for the treatment of renovascular hypertension. The first finding was that blood pressure normalized after 21 days of treatment. The second finding was a reduction in RSNA and enhanced sympathetic responsiveness. The third finding was restoration of renal function as assessed by the urinary excretion of water, Na^+ , K^+ , Cl^- , and urea, and the urinary flow and GFR.

During the early phase of 2K1C hypertension, while SBP is increasing (up to 4weeks after clipping), the increase has been attributed to a combination of elevated Ang II, altered plasma volume, changes in renal function, and increased renal nerve activity.^{3,4,7,16} Blocking the RAAS by inhibiting renin with ALSK could therefore contribute to reducing renovascular hypertension in the rat model we studied. However, we found that ALSK monotherapy did not reduce SBP. On the other hand, studies in humans have demonstrated a reduction of blood pressure.¹⁴ Nevertheless we cannot refute that a higher dose of ALSK monotherapy in our experimental protocol could evoke more robust effects. The same dose of aliskiren used in this study was previously used by Martins-Oliveira et al.²¹, the authors also observed that after 3 weeks of treatment with aliskiren and losartan was unable to reduce blood pressure. Reduction of blood pressure could only be observed after 4 weeks of treatment. The hypotensive effect of ALSK is potentiated when used in combination with diuretics or blockers of the RAAS.²² Moreover, monotherapy with L-ARG was able to reduced but not normalize SBP, as observed in this study and in previous studies from our laboratory.¹⁶ However, our most important finding is that the combination of these therapies significantly reduced the blood pressure of the hypertensive rats. It has been postulated that the major factors in the development of 2K1C hypertension are an increase in Ang II and endothelial

dysfunction.²³ Blocking the renin associated with administration of exogenous L-ARG could, via production of nitric oxide (NO), restore endothelial function and reduce blood pressure in experimental hypertension.

Our results with regard to the decrease of RSNA also suggest that the antihypertensive effect of ALSK and L-ARG could be partially due to reduced sympathetic activity. The paraventricular nucleus (PVN) is an important regulator of sympathetic outflow via projections to the intermediolateral column of the spinal cord and the RVLM. Within the PVN, Ang II enhances the sympathetic activity and blood pressure of 2K1C rats, whereas NO has a sympathoinhibitory effect in the PVN and its reduction in RVLM cause sympathoexcitation in hypertension²⁴. Overexpression of nNOS in the PVN may be responsible for increased suppression of sympathetic outflow.^{25,26} Thus, the ALSK inhibition of renin would reduce the levels of Ang II and L-ARG, increasing the bioavailability of NO, as shown by reduced RSNA.

The 2K1C group showed a significant reduction in urinary flow and GFR, which can be explained by the vasoconstriction caused by Ang II in glomerular capillaries affecting renal blood flow and GFR. ALSK treatment was not able to restore these parameters. This result agrees with studies demonstrating that RAAS inhibitors can cause renal failure in situations where there is an impairment of renal blood flow, as in renovascular hypertension.⁴ On the other hand, NO modulates the 2K1C phases of hypertension because its vasodilatory effect can counteract the vasoconstriction of Ang II, maintaining perfusion of the kidneys.²⁷ This is in agreement with our results: the animals treated with L-ARG, either alone or with ALSK, showed improvement in urinary flow and GFR.

Our results showed that the 2K1C group had impaired urinary water, Na⁺, Cl⁻ and urea excretion after 28 days' hypertension. Moreover, in this group, the K⁺ excretion and the

plasma urea were increased while urinary flow was reduced. This result illustrates the injurious effects of hypertension on renal function. Several studies have shown that these injuries are related to Ang II and, after treatment with losartan, basal renal hemodynamics (corrected for kidney weight) were similar in both non-clipped and clipped kidneys of chronic-phase 2K1C hypertensive rats²³ and in the renal medullas of both kidneys of 2K1C rats, ACE mRNA levels and activity are increased, and most of the renin present is active.²⁸ Treatment with ALSK alone was not able to improve these parameters, but, when combined with L-ARG, their values did not differ from the SHAM group. Improvement of these parameters was observed in the group treated with L-ARG alone, indicating that NO can modulate renal vasoconstriction and renal dysfunction, in addition to the RAAS. In previous studies, we observed that treatment with oral L-ARG can increase sodium and water excretion¹⁶ because NO contributes significant vasodilator tone, buffering the hypertension and maintaining perfusion of both kidneys.²³

Renovascular hypertension promoted left ventricular hypertrophy in the 2K1C group, which may be explained by the increase of Ang II, which in turn exerted an inotropic effect and promoted the proliferation and hypertrophy of cardiac fibroblasts, leading to myocyte hypertrophy.²⁹ ALSK treatment did not reduce cardiac hypertrophy. Other studies suggest an explanation: that direct blocking of renin reduces the ability to degrade angiotensinogen and produce Ang I, but not to inhibit the pro-fibrosis signal induced by the renin/pro-renin receptor^{21,30}. However, the groups treated with L-ARG did not show left ventricular hypertrophy, which suggests that the progression of cardiac damage caused by renovascular hypertension was prevented.

Likewise, the 2K1C and 2K1C ALSK rats showed atrophy of the clipped kidney and hypertrophy of the non-clipped kidney, and only the ALSK + L-ARG combination reduced the weight of non-clipped kidney. It is known that Ang II causes vasoconstriction leading to

glomerular hypertrophy with increased connective tissue and to extracellular matrix deposition.³¹ On the other hand, NO prevents glomerular hypertrophy because the plasma concentrations of ADMA (an endogenous inhibitor NO synthesis) increases markedly in patients with hypertension and is responsible for inducing vascular and glomerular fibrosis.³²

Three NOS isoforms are expressed in the kidney, of which the endothelial NOS (eNOS) is important for the maintenance of glomerular filtration rate, regional vascular tone, and renal blood flow, so it has an important role in the pathophysiology of renovascular hypertension.^{33,34} We found a decrease in eNOS expression only in the clipped kidney. Helle et al. 2009 also demonstrated that the expression of eNOS in pre-glomerular resistance vessels (afferent arteriole) was reduced only in the clipped kidney. This can reduce the NO release and explain the difference between the clipped and non-clipped kidney because there is a connection between shear stress and eNOS synthesis, and in the clipped kidney, shear stress is reduced, thereby reducing the incentive for the eNOS synthesis, limiting the release of NO and promoting a reduction in urinary flow.²⁷

iNOS is expressed in the kidney under pathological conditions, such as renovascular hypertension, in tubules and in the glomerular mesangium.³³ The nuclear factor kappa-B (NFK-B) is activated by reactive oxygen species to induce the expression of the gene for iNOS.³⁵ This fact confirms our finding of increased iNOS expression in 2K1C rats. Studies indicate that iNOS plays an important role in the protection of the ischemic kidney, which can be explained by the interstitial inflammation stimulating iNOS to generate NO, in an attempt to mitigate the post-ischemic interactions between leukocytes and endothelium.³⁶ Moreover, studies have shown that increased ROS production and iNOS expression lead to an overproduction of superoxide anion that induce cardiovascular alterations that contribute to hypertension.³⁷ Thus, the beneficial or adverse effects of iNOS in hypertension can depend on the organ and the model studied.

The neuronal NOS (nNOS) is expressed primarily in the macula densa and participates in the control of glomerular hemodynamics via tubulo-glomerular feedback and renin release.³³ Thus, nNOS protein levels have been reported to correlate inversely with developing kidney damage.³⁸ In the renal cortex, nNOS mediates the synthesis of renin, dilates the afferent arterioles, and reduces the reabsorption of sodium.³² Our data demonstrate a decrease in the expression of nNOS in the non-clipped kidney of 2K1C rats, which is directly related to the pathophysiology of the hypertensive model, demonstrating hemodynamic changes in both kidneys.

L-ARG infusion in the kidneys is reported to stimulate intrarenal NO production by enhancing NOS activity in vivo.³⁵ We found that exogenous administration of L-ARG for 21 days increased the expression of eNOS, nNOS and iNOS. Rusai et al. (2008)³⁸ showed that in kidneys that underwent ischemia, supplementation with L-ARG for 7 days increased the expression of mRNA for the three isoforms of NOS. Intrarenal NO production stimulated by L-ARG also increases renal sodium excretion by a direct tubular action, and by regulating vascular tone in the pressure natriuretic response in the renal medulla.³⁵ On the other hand, 2K1C rats showed increased of iNOS expression, but decreased of eNOS and nNOS expression. Evidence has been accumulating that, in pathological states, iNOS may be overexpressed, and both eNOS and nNOS expression can be altered.³⁵ Ischemia decreases L-ARG concentrations in the renal cortex and medulla, resulting in a decreased substrate supply for NO synthesis. This situation can be reversed by exogenous supplementation of L-ARG,³⁸ as was also demonstrated in this study.

Our results demonstrate that sympathetic afferent activity from the kidney participates in the genesis of the hypertension induced in the two-kidney one-clip model. Oral administration of aliskiren and L-arginine normalizes the RSNA and SBP, suggesting that the Ang II and NO are involved in the enhanced sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats.

Combined drug treatment is more efficient than monotherapy, demonstrating that both the RAAS and NO contribute to the pathogenesis of hypertension, as shown by the fact that L-arginine alone is capable of reducing but not normalizing blood pressure levels in a renovascular hypertension model. This new treatment proposal could reduce blood pressure levels, in addition to improving renal and cardiac functions and sympathetic activity, and would protect target organs.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by a CNPq research grant to R.V. Tiradentes, and a CAPES grant to C.H. Santuzzi. This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil).

References

- 1 Esler M. Sympathetic nervous system: contribution to human hypertension and related cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **26**: S24–S28.
- 2 Esler M. The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens* 2000; **13**: 99S–105S.
- 3 Johansson M, Elam M, Rundqvist B, Eisenhofer G, Herlitz H, Lambert G, Friberg P. Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension. *Circulation* 1999; **99**: 2537–2542.
- 4 Burke SL, Evans RG, Head GA. Effects of chronic sympatho-inhibition on reflex control of renal blood flow and plasma rennin activity in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 2010; **159**: 438–448.
- 5 Burke SL, Head GA. Cardiac and renal baroreflex control during stress in conscious renovascular hypertensive rabbits: effect of rilmenidine. *J Hypertens* 2009; **27**: 132–141.
- 6 Katholi RE, Whitlow PL, Winternitz SR, Oparil S. Importance of the renal nerves in established two-kidney,one clip Goldblatt hypertension. *Hypertension* 1982; **4**: 166–174.
- 7 Rossi NF, Maliszewska-Scislo M, Chen H, Black SM, Sharma S, Ravikov R, Augustynia RA. Neuronal nitric oxide synthase within paraventricular nucleus: blood pressure and baroreflex in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Exp Physiol* 2010; **95**(8): 845–857.
- 8 McBryde FD, Guild SJ, Barrett CJ, Osborn JW, Malpas SC. Angiotensin II-based hypertension and the sympathetic nervous system: the role of dose and increased dietary salt in rabbits. *Exp Physiol* 2007; **92**: 831–840.

- 9 Ishimitsu T, Numabe A, Masuda T, Akabane T, Okamura A, Minami J, Matsuoka H. Angiotensin-II receptor antagonist combined with calcium channel blocker or diuretic for essential hypertension. *Hypertens Res* 2009; **32**: 962–968.
- 10 Chen AD, Zhang SJ, Yuan N, Xu Y, De W, Gao XY, Zhu GQ. Angiotensin AT1 receptors in paraventricular nucleus contribute to sympathetic activation and enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. *Exp Physiol* 2010; **96**(2): 94-103.
- 11 Zhu GQ, Xu Y, Zhou LM, Li YH, Fan LM, Wang W, Gao XY, Chen Q. Enhanced cardiac sympathetic afferent reflex involved in sympathetic overactivity in renovascular hypertensive rats. *Exp Physiol* 2009; **94**: 785–794.
- 12 Nishikawa T, Omura M, Saito J, Matsuzawa Y. The possibility of resistant hypertension during the treatment of hypertensive patients. *Hypertens Res* 2013;**36**:924-929.
- 13 Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, Brunner HR. Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril. *Hypertension* 2002; **39**(1): E1-8.
- 14 Chen Y, Meng L, Shao H, Yu F. Aliskiren vs. other antihypertensive drugs in the treatment of hypertension: a meta-analysis. *Hypertens Res* 2013; **36**(3):252-261.
- 15 Chou CL, Pang CY, Lee TJ, Fang TC. Direct renin inhibitor prevents and ameliorates insulin resistance, aortic endothelial dysfunction and vascular remodeling in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertens Res* 2013; **36**:123-128.
- 16 Gouvêa SA, Moysés MR, Bissoli NS, Pires JGP, Cabral AM, Abreu GR. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 2002; **7**: 943-949.

- 17 Gouvea SA, Bissoli NS, Moysés MR, Cicilini MA, Pires JGP, Abreu GR. Activity of Angiotensin-Converting Enzyme after Treatment with L-Arginine in Renovascular Hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2004; **56**: 569-579.
- 18 Graceli JB, Cicilini MA, Bissoli NS, Abreu GR, Moysés MR. Roles of estrogen and progesterone in modulating renal nerve function in the rat kidney. *Braz J Med Biol Res* 2013; **46**: 521-527.
- 19 Liu JL, Murakami H, Sanderford M, Bishop VS, Zucker IH. ANG II and baroreflex function in rabbits with CHF and lesions of the area postrema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; **277**: H342–H350.
- 20 Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951; **193**(1): 265-275.
- 21 Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DMM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes D, Reis RI, Costa-Neto CM, Casarini DE, Ribeiro AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *Int J Cardiol* 2013; **167**(4): 1199-1205.
- 22 Yoshitomi Y, Tarutani Y, Tsujibayashi T, Yamaguchi A, Ishii T, Kaneki M, Kawanishi K, Minai K, Saitou Y, Sakurai S, Suwa S. Effectiveness of the direct renin inhibitor, aliskiren, in patients with resistant hypertension. *Int Heart J* 2013; **54**(2): 88-92.
- 23 Sigmon DH, Beierwaltes WH. Influence of Nitric Oxide in the Chronic Phase of Two-Kidney, One Clip Renovascular Hypertension. *Hypertension* 1998; **31**: 649-656.
- 24 Kishi T. Regulation of the sympathetic nervous system by nitric oxide and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla: 2012 Academic Conference Award from the Japanese Society of Hypertension. *Hypertens Res* 2013; **36**: 845-851.

- 25 Xu B, Chen WW, Fan ZD, Han Y, Xiong XQ, Gao XY, Zhu GQ. Responses of neurons in paraventricular nucleus to activation of cardiac afferents and acute myocardial ischemia in rats. *Exp Physiol* 2011; **96**: 295–304.
- 26 Zhong MK, Duan YC, Chen AD, Xu B, Gao XY, De W, Zhu GQ. Paraventricular nucleus is involved in the central pathway of cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *Exp Physiol* 2008; **93**: 746–753.
- 27 Helle F, Hultström M, Skogstrand T, Palm F, Iversen BM. Angiotensin II-induced contraction is attenuated by nitric oxide in afferent arterioles from the nonclipped kidney in 2K1C. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **296**: F78-F86.
- 28 Prieto MC, González-Villalobos RA, Botros FT, Martin VL, Pagán J, Satou R, Lara LS, Feng Y, Fernandes FB, Kobori H, Casarini DE, Navar LG. Reciprocal changes in renal ACE/ANG II and ACE2/ANG 1–7 are associated with enhanced collecting duct renin in Goldblatt hypertensive rats . *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; **300**: F749–F755.
- 29 Rizzi E, Castro MM, Ceron CS, Neto-Neves EM, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Tempol inhibits TGF- β and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. *Int J Cardiol* 2013; **165**(1): 165-173.
- 30 Scheffe JH, Neumann C, Goebel M, Danser J, Kirsch S, Gust R, Kintscher U, Unger T, Funke-Kaiser H. Prorenin engages the (pro)rennin receptor like rennin and both ligand activities are unopposed by aliskiren. *J Hypertens* 2008; **26**: 1787-1794.
- 31 Whaley-Connell A, Habibi J, Nistala R, Hayden MR, Pulakat L, Sinak C, Locher B, Ferrario CM, Sowers JR. Combination of direct renin inhibition with angiotensin type 1 receptor blockade improves aldosterone but does not improve kidney injury in the transgenic Ren2 rat. *Regul Peptides* 2012; **176**: 36–44.

- 32 Tain YL, Hsu CN, Lin CY, Huang LT, Lau YT. Aliskiren prevents hypertension and reduces asymmetric dimethylarginine in young spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2011; **670**: 561–565.
- 33 Cherla G, Jaimes EA. Role of L-Arginine in the Pathogenesis and Treatment of Renal Disease. *J Nutr* 2004; **134**: 2801S–2806S.
- 34 Wickman A, Andersson IJ, Jia J, Bergström G. Endothelial nitric oxide synthase protein is reduced in the renal medulla of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; **19**(9): 1665-1673.
- 35 Huang HS, Ma MC, Chen J. Chronic l-arginine administration increases oxidative and nitrosative stress in rat hyperoxaluric kidneys and excessive crystal deposition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **295**: F388-F396.
- 36 Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible Nitric-oxide Synthase Is an Important Contributor to Prolonged Protective Effects of Ischemic Preconditioning in the Mouse Kidney. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27256-27266.
- 37 Cau SBA, Guimaraes DA, Rizzi E Ceron CS, Souza LL, Tirapelli CR, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol* 2011; **164**(2): 372-381.
- 38 Rusai K, Fekete A, Szebeni B, Vannay A, Bokodi G, Müller V, Viklicky O, Bloudickova S, Rajnoch J, Heemann U, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Szabó AJ. Effect of inhibition of neuronal nitric oxide synthase and L-arginine supplementation on renal ischaemia-reperfusion injury and the renal nitric oxide system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; **35**: 1183–1189.

Legends

Table 1. Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the systolic blood pressure (SBP, mmHg), kidney and left ventricle weight ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) in 2K1C rats.

Table 2. Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the urinary excretion, urinary flow and glomerular filtration rate (GFR) in 2K1C rats.

Figure 1. Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the baseline renal sympathetic nerve activity (RSNA) in 2K1C rats.

**P<0.01 and *P<0.05 compared with Sham; ##P<0.01 compared with 2K1C.

Figure 2. Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the baseline renal sympathetic nerve activity (RSNA) in 2K1C rats after phenylephrine (PE) and sodium nitroprusside (SNP) injections.

**P<0.01 and *P<0.05 compared with Sham; ##P<0.01 compared with 2K1C; ++P<0.01 and +P<0.05 compared with 2K1C ALSK; †P<0.01 compared with 2K1C L-ARG.

Figure 3. Protein expression of neuronal nitric oxide synthase in the clipped and non clipped kidneys.

Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the densitometric analyses of western blots for neuronal nitric oxide synthase (nNOS). **P<0.01 compared with Sham; ##P<0.01 and #P<0.05 compared with 2K1C; +P<0.05 compared with 2K1C ALSK.

Figure 4. Protein expression of inducible nitric oxide synthase in the clipped and non clipped kidneys.

Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the densitometric analyses of western blots for inducible nitric oxide synthase (iNOS). ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ compared with Sham; ## $P < 0.01$ compared with 2K1C; ++ $P < 0.01$ compared with 2K1C ALSK; †† $P < 0.01$ compared with 2K1C L-ARG.

Figure 5. Protein expression of endothelial nitric oxide synthase in the clipped and non clipped kidneys.

Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the densitometric analyses of western blots for endothelial nitric oxide synthase (eNOS). * $P < 0.05$ compared with Sham; ## $P < 0.01$ compared with 2K1C; ++ $P < 0.01$ compared with 2K1C ALSK; †† $P < 0.01$ compared with 2K1C L-ARG.

Table 1. Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the systolic blood pressure (SBP, mmHg), kidney and left ventricle weight (mg.g⁻¹) in 2K1C rats.

	SHAM	2K1C	2K1C ALSK	2K1C L-ARG	2K1C ALSK+L-ARG
SBP Day 0	119.2±2.52	117.6±3.7	115.8±3.54	121.8±2.2	117.2±2.27
SBP Day 7	120.2±3.64	204.4±12.7*	217.8±10.2*	197.5±8.92*	197.14±6.1*
SBP Day 28	114.4±5.2	196.8±6.79*	202.4±17.7*	175.6±9.14*	138.4±4.38 ^{##}
Direct SBP	108.3±5.21	198.3±13.39*	198.7±9.09*	167.9±13.5*	140.8±9.74 ^{##}
Kidney weight (non clipped)	4.1±0.17	6.1±0.5*	6.1±0.82*	4.3±0.33	4.0±0.36 ^{##}
Kidney weight (clipped)	4.1±0.17	2.3±0.31 ^{**}	2.1±0.35 ^{**}	3.4±0.21	3.1±0.28
Left Ventricle	2.2±0.04	3.3±0.17 ^{**}	2.7±0.14	2.2±0.14 ^{##}	2.4±0.25 ^{##}

Data are shown as mean ± S.E.M. (n=7–9 per group). ^{**}P<0.01 and ^{*}P<0.05 versus the Sham group; ^{##}P<0.01 and [#]P<0.05 versus the 2K1C group; ⁺⁺P<0.01 and ⁺P<0.05 versus the 2K1C ALSK group.

Table 2. Effects of aliskiren (ALSK), L-arginine (L-ARG) or aliskiren plus L-arginine (ALSK+L-ARG) treatment on the urinary excretion, urinary flow and glomerular filtration rate (GFR) in 2K1C rats.

	SHAM	2K1C	2K1C ALSK	2K1C L-ARG	2K1C ALSK+L-ARG
Excretion volume (mL/day)	20.0±2.04	11.1±0.57*	9.1±1.04**	16.7±3.24	14.0±2.23
Urinary flow (mL.min)	0.014±0.0004	0.007±0.0002**	0.006±0.0005**	0.012±0.002 ^{##++}	0.011±0.0002 ^{#+}
GFR (mL.min)	1.06±0.19	0.285±0.03**	0.37±0.04**	1.3±0.13 ^{###++}	1.09±0.16 ^{###++}
Na ⁺ excretion (mEq/day)	148.0±14.1	48.2±7.9**	48.5±9.2**	120.6±8.2 ^{###++}	129.8±4.5 ^{###++}
K ⁺ excretion (mEq/day)	59.9±6.25	127.4±12.4*	54.8±6.33 ^{##}	78.3±12.2 [#]	49.4±2.57 ^{##}
Cl ⁻ excretion (mEq/day)	273.8±27.01	123.6±21.81*	133.7±29.50*	241.8±12.81 ^{##}	279.8±37.57 ^{##}
Urinary Urea (mg/mL)	3408±538.3	1288±282.1**	1287±81.1**	4399±314.3 ^{###++}	4234±425.4 ^{###++}
Plasmatic Urea (mg/mL)	52.0±4.07	84.8±4.23*	80.8±10.58*	50.0±6.57 ^{##}	55.6±4.72 [#]

Data are shown as mean ± S.E.M. (n=7–9 per group). **P<0.01 and *P<0.05 versus the Sham group; ^{##}P<0.01 and [#]P<0.05 versus the 2K1C group; ⁺⁺P<0.01 and ⁺P<0.05 versus the 2K1C ALSK group.

